

**VARIATION DES LYSOZYMGEHALTES IM BLUT
UND IN DER MILCH VON GESUNDEN UND
EUTERKRANKEN KÜHEN**

Peter Götze

1977

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter Leitung von: Prof. Dr. H. Buschmann

VARIATION DES LYSOZYMGEHALTES IM BLUT
UND IN DER MILCH VON GESUNDEN UND
EUTERKRANKEN KÜHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Peter Götze
aus Ludwigsburg

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Prof. Dr. H. G. Buschmann
Korreferent:	Prof. Dr. H. Kräußlich

Tag der Promotion: 25. Februar 1977



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Schrifttum</u>	2
2.1. Definition	2
2.2. Geschichte	3
2.3. Lysozymvorkommen bei versch. Spezies	4
2.3.1. Mensch	4
2.3.2. Tiere	4
2.3.3. Pflanzen	5
2.3.4. Bakterien	5
2.4. Lysozymvorkommen in Zellen und Gewebeflüssigkeiten	7
2.5. Bedeutung für den Organismus	13
2.6. Chemische Struktur	14
2.7. Physikalisch-chemische Eigenschaften	21
2.8. Biologische Eigenschaften	26
2.9. Resistenz	34
2.10. Antigene Eigenschaften	36
2.11. Wechselwirkung mit anderen Substanzen	37
2.12. Lysozymnachweis	38
2.13. Diagnostische Bedeutung	39
2.14. Lysozym in der Therapie	42
2.15. Lysozym und Mastitis	43
3. <u>Material und Methoden</u>	45
3.1. Tiermaterial	45
3.2. Aufbereitung der Proben	46
3.3. Bestimmung des Lysozymgehaltes	47

4.	<u>Ergebnisse</u>	51
4.1.	Lysozymkonzentration des Blutes	51
4.2.	Lysozymkonzentration der Milch	51
4.3.	Beziehung zwischen der Lysozymkonzentration des Blutes und der Milch	53
4.4.	Beziehung zwischen Lysozymkonzentration und pH in den Eutervierteln	54
4.5.	Einfluß der Keimart auf Lysozymgehalt und pH in den Eutervierteln	56
4.6.	Abhängigkeit der Lysozymwerte in Blut und Milch von Alter und Laktationsstadium	60
5.	<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	65
6.	<u>Zusammenfassung</u>	69
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	71

1. EINLEITUNG

Bei Lysozym handelt es sich um ein Enzym, das zum Mechanismus der unspezifischen Körperabwehr gehört. Obwohl es schon lange bekannt ist und in vielfältiger Richtung bei Mensch und Tier untersucht worden ist, wurde ihm in letzter Zeit wieder vermehrtes Interesse entgegengebracht. Der Grund ist darin zu suchen, daß wegen der im Zusammenhang mit dem umfangreichen Einsatz von Chemotherapeutika bei Mensch und Tier auftretenden Schwierigkeiten, wie Resistenzerscheinungen, Rückstände in Nahrungsmitteln, Unverträglichkeiten, Toxizität etc., den unspezifischen Abwehrfaktoren des Körpers wieder mehr Beachtung geschenkt und die Möglichkeit einer genetischen Selektion auf Infektionsresistenz beim Tier in Erwägung gezogen wird.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Lysozymkonzentration in Blut und Milch von Kühen zu bestimmen und ihre Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie Laktationsstadium und Alter der Tiere, zu untersuchen. Dabei war die Frage von Interesse, inwieweit der Lysozymgehalt des Blutes Einfluß hat auf die Lysozymkonzentration im Euter, und bis zu welchem Grade das Euter bezüglich der unspezifischen Infektionsresistenz als geschlossenes System angesehen werden kann.

2. S C H R I F T T U M

2.1. DEFINITION

Lysozym ist eine N-acetylmuramid-glykanohydrolase, früher auch als β -Glucosaminidase und Muraminidase bezeichnet. Lysozym hat keine Protease-, Kinase-, Amylase-, Lipase- oder Phosphatase-Aktivität (96).

Als Substrat dienen N-acetylglucosamin- und N-acetylmuraminsäurereste, die durch β -(1-4) Bindungen miteinander verknüpft sind.

JOLLÈS (79) gibt folgende Eigenschaften als Kriterien für die Zugehörigkeit zur Familie der Lysozyme an:

Der Stoff muß:

1. ein basisches Protein sein
2. ein kleines Molekulargewicht besitzen (ca. 15 000)
3. in sauren Medien thermostabil sein (pH 4,5; 100°C; 1-8 min)
4. in alkalischen Medien thermolabil sein
5. Suspensionen oder Zellwände von Bakterien (Mikrococcus lysodeikticus, Bacillus megatherium und Bacillus subtilis) leicht lysieren.
6. bei der Bakteriolyse Bruchstücke freisetzen, die mit spezifischen Reagenzien für Aminosucker (N-acetylglucosamin, N-acetylmuraminsäure) reagieren.

Avidin, Streptavidin und α -Laktalbumin werden neuerdings auch zur Familie der Lysozyme gerechnet, da diese Stoffe in einer großen Zahl von Aminosäureresten übereinstimmen und daher bei ihnen ein gemeinsames Stammgen vermutet wird (17, 36, 59).

2.2. GESCHICHTE

Bereits vor der letzten Jahrhundertwende machten mehrere Autoren auf die "bakterizide und entwicklungshemmende Eigenschaft der Tränenflüssigkeit" aufmerksam. Nach 1900 erschienen einige Arbeiten über die antiseptische Wirkung der Tränen.

1922 wird von FLEMING (50) im Nasenschleim ein bakteriolytisches Prinzip entdeckt. In der Annahme, es sei ein Enzym, nennt er es Lysozym = lysierendes Enzym. Am 12. Februar 1922 erfolgt die Bekanntgabe in Form eines Vortrages mit dem Titel: "On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions."

Lysozym ist das erste Enzym, dessen Struktur vollständig aufgeklärt wurde. Wichtige Daten auf diesem Wege waren die 1927 erfolgte Isolierung aus Hühnereiweiß durch WOLFF (122) mittels Präzipitation mit kolloidalem Eisenhydroxyd, Dialyse und wiederholter Präzipitation mit Aceton, die Aufklärung der Primärstruktur 1963 durch CANFIELD (20) und der erste Bericht über Einzelheiten der räumlichen Struktur 1965 durch PHILLIPS und Mitarbeiter (11) .

2.3. DAS VORKOMMEN VON LYSOZYM IM TIER- UND PFLANZENREICH

2.3.1. Mensch. Beim Menschen kommt Lysozym in den meisten Körpersäften und Sekreten vor. FLEMING (51) fand es in allen untersuchten Geweben außer normalem Urin, Schweiß und Cerebrospinalflüssigkeit. Nach SCHLIESSER befindet sich kein Lysozym in Galle und Kammerwasser, nach SCHUMACHER (122) keines in Schweiß, Linse, Faeces und Kammerwasser. BRAUN (15,16) beschreibt das Fehlen von Lysozym in Urin, Liquor und dem Stuhl Erwachsener und darmgesunder älterer Kinder. Bei Brustkindern kommt es nach seinen Beobachtungen im Stuhl vor, nicht jedoch bei Kuhmilchernährung. Sonst hält er Lysozym im Stuhl für pathologisch.

Als pathologisch wurde ein Lysozymvorkommen außerdem beschrieben bei Ascites, Eiter, Entzündungsexudat, Hydrocele, Tbc-Kavernen, Magenculcusschleim, Ovarialcysten und Pleuraerguß (122).

2.3.2. Tiere. Auch im Tierreich wurde Lysozym oft untersucht. Man konnte es nachweisen bei Rind, Pferd, Schaf, Ziege, Schwein, Hund, Pavian, Meerschweinchen, Ratte und Maus, außerdem bei Fischen und Vögeln. Kaninchen und Meerschweinchen besitzen viel weniger Lysozym als der Mensch, der Hund soll eine Zwischenstellung einnehmen (51). Auch bei Vögeln bestehen offenbar artbedingte Unterschiede. Messung der Hemmzone für *M. lysodeikticus*-Wachstum nach Beimpfen mit Lysozym ergab folgende Werte:

Für Hühnereiweiß	:	24 mm
Für Teichhuhnereiweiß	:	11 mm
Für Drossel und Bachstelze	:	16 mm

Der Hecht hat im Gewebe viel Lysozym. Der Knorpel scheint eine so große Konzentration zu besitzen wie der menschliche. Auch der Laich ist sehr stark lysozymhaltig (51).

- 2.3.3. Pflanzen. In Pflanzen ist Lysozym ebenfalls häufig anzutreffen. Von den Gartengemüsen hat die Rübe den höchsten Lysozymgehalt, der jedoch gering ist im Vergleich zu Menschen-Lysozymen (51). MEYER (98) entdeckte Lysozym in Papain und Ficin, das aus der Gummimilch von *Ficus glabrata* und *Ficus doliana* entsteht. Die antibakterielle Wirksamkeit war bei diesen Enzymen aber im Vergleich zu Hühnereiweiß-Lysozym etwa um die Hälfte geringer.
- 2.3.4. Bakterien. HAWIGER (69) untersuchte 503 Stämme von *Staphylococcus aureus* und 35 von *Staphylococcus epidermidis*. Von den *Staphylococcus aureus*-Stämmen erzeugten alle, von den *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen 13 ein Enzym, das *Mikrococcus lysodeikticus* lysierte. JAY (76) stellte bei 120 von 126 Koagulase-positiven und bei 4 von 49 Koagulase-negativen Staphylokokken-Stämmen eine Lysozymproduktion fest. Er schlägt diese Lysozymproduktion als ein Kriterium für die Pathogenität vor, da sie besser als die α -Haemolysin-Produktion oder die Eigelb-Präzipitation mit dem Ausfall der Koagulase-Reaktion korreliert sei, die als wichtigstes Kennzeichen der Pathogenität allgemein akzeptiert werde. Eine russische Forschergruppe fand bei 78,7 % von 146 pathogenen Staphylokokken-Stämmen Lysozymvorkommen. Davon zeigten 93 % positive Plasmakoagulation. Es wird auch hier die Lysozymerzeugung als zusätzlicher Test für Pathogenität empfohlen, besonders wenn die Plasmareaktion negativ ist (124). Ähnliche Beobachtungen konnte ZIV (146) machen. Von 912 Koagulase-positiven Staphylokokken-Stämmen produzierten 98 % Lysozym.

Einen anderen Aspekt beschreibt GROSSGEBAUER (65). Er hält Lysozymproduktion für einen Index für Stämme tierischen Ursprungs, da seine Untersuchungen folgendes Ergebnis brachten:

1088 von 1104 Koagulase-positiven Staphylokokken-Stämmen humanen Ursprungs und alle 88 untersuchten Koagulase-negativen Stämme waren Lysozym-positiv.

Dagegen waren alle 85 Staphylokokken-Stämme tierischen Ursprunges Lysozym-positiv, aber nur 10 Koagulase-positiv.

2.4. DAS VORKOMMEN VON LYSOZYM IN DEN ZELLEN UND GEWEBEFLOSSIGKEITEN VON MENSCH UND HAUSTIER

Den höchsten Lysozymgehalt menschlicher Sekrete fand BRAUN (16) in Tränenflüssigkeit, Speichel und Muttermilch. Die Angaben über den Gehalt der Milch schwanken allerdings beträchtlich. BRAUN (16) gibt ihn mit 100-200 mg/l an, CHANDAN (24) fand durchschnittlich 39 bzw. 46 mg/100 ml Milch bzw. Kolostrum, JOLLÈS (78) 40 mg/l Milch und KIMURA (85) 10-20 mg/l Milch.

Die Lysozymwerte der Milch von Tieren werden von CHANDAN (25) wie folgt angegeben:

Kuh	13	mg/100ml Milch
Ziege	25	mg/100ml Milch
Schwein	0	mg/100ml Milch
Schaf	10	mg/100ml Milch

Der Wert für die Sau ist jedoch nach einer Arbeit von POSPISIL und CERNOHOUS (116) in Frage gestellt. Diese Autoren fanden einen Durchschnittswert $>10 \gamma$ /ml Sauenmilch.

CHANDAN (25) wies auch Lysozym in der Milch von Esel und Stute nach. Das wurde von CATTANEO (22) ebenfalls belegt. Dieser Autor fand auch Lysozym in der Milch der Hündin und der Sau. BUSS (18) beschrieb das Lysozymvorkommen in der Pavianmilch.

Die Tränenflüssigkeit von Kaninchen, Pferd, Schaf und Truthahn haben eine mindestens 30 mal schwächere Lysozymaktivität als menschliche Tränenflüssigkeit (51).

Der Speichel von Kaninchen enthält 3-4 mal höhere Lysozym-Werte als das Plasma und Serum, deren Spiegel ähnlich sind (77). Auf Grund der Lysozymaktivität des Speichels konnte CERNYCH (23) die Rinderrassen Istoben und Schwarzbunte nicht unterscheiden.

DUKELOW, CHERNOFF und WILLIAMS (35) fanden den Lysozymgehalt in der Uterusflüssigkeit nach Insemination erhöht, konnten aber keinen Einfluß von Lysozym auf die Samenendreiife nachweisen.

Die größte Lysozymkonzentration der Gewebe haben nach HANSEN (68) Knochenmark, Lunge, Darm, Milz und Niere. GREENWALD (60) wies Lysozym in menschlichen Rippen- und hyalinen Knorpeln nach. Er maß den Gehalt an Lysozym und fand 1,45-3,36 $\mu\text{g L/mg}$ Knorpel, wobei der Gelenkknorpel ärmer an Lysozym als der Rippenknorpel war und der Faserknorpel aus dem Gelenk nur Spuren enthielt. Er fand Lysozym auch in Rinder- und Hundescapula, in Mäusefemur und im embryonalen Hühnerskelett. In der Rinderscapula war der Lysozymgehalt am höchsten in der hypertrophen Zone, die an die Zone der Kalzifikation anschließt. Der Lysozymgehalt rachitischen Knorpels war vergleichbar dem des normalen Gewebes. Als Substrat dienten GREENWALD (61) die Tibia rachitischer männlicher Ratten von 50 g Ausgangsgewicht nach 4 Wochen Phosphor- und Vitamin D-loser Diät. Ein Verlust von Knochen-Lysozym konnte durch Parathormon-Injektion erreicht werden, die eine Mobilisierung von Kalzium aus den Röhrenknochen auslöste.

In der gesunden Cornea findet sich nach SCHUMACHER (122) eine geringe Lysozym-Aktivität bei Mensch, Esel, Pferd und Hund.

Hühnereiweiß hat die höchste bekanntgewordene Lysozymkonzentration. FLEMING (51) fand noch in einer Verdünnung von 1:60 Millionen einen lytischen Effekt, nicht dagegen im Eigelb.

NIEWIAROWICZ (107) gibt die Lysozymkonzentration des Eiklars mit 3,5% an und bezeichnet das Lysozym des Eiklars als wirksamen Enzyminhibitor und wichtigen antibakteriellen Schutz des Eies. Allerdings differiert der Lysozymanteil im Eiklar etwas. Er sinkt in der Reihenfolge Leghorn > Rhodeländer > Steirer > White Rocks (111). Von Eiern der Weißen Leghorn Rasse wurden die Hagelschnüre mechanisch abgetrennt und auf Lysozym untersucht. BAKER (8) fand dabei Werte zwischen 44 und 130 mg/g. Der Lysozymwert in den Hagelschnüren war jedoch stets 2-3mal größer als im restlichen Eiklar.

Russische Forscher beschäftigten sich mit dem Eiweiß aus Eiern der Rasse Leghorn. Nach ihren Angaben verläuft der steigende Proteingehalt nicht mit der Lysozymaktivität parallel. Diese zeigte vom ersten bis zum dritten Tag einen deutlichen Anstieg, fiel aber bis zum 5. Tag wieder auf den Ausgangswert zurück und sank anschließend weiter ab (113).

Ein anderes Team dagegen konnte in Hühnereiern eine Erhöhung der Lysozymwerte relativ zu den anderen Bestandteilen des Proteinkomplexes feststellen (74).

Die Serum-Lysozymwerte gesunder Menschen werden mit durchschnittlich

0,01	mg %	SCHUMACHER (122)
18	μ g/ml	SENN (125)
5	γ /ml	INOUE (117)

angegeben.

Serumwerte von Tieren:

Kaninchen	:	1,5 γ /ml	POSPISIL (117)
Meerschweinchen	:	1,25 γ /ml	(117)

Zwischen der Lysozymaktivität im Serum und der in den Tränen besteht keine Beziehung. Zu diesem Ergebnis kam COVEY (28), der 39 Patienten mit verschiedenen Krankheiten daraufhin untersuchte. Er schließt daraus, daß Lysozym nicht aus dem Blut filtriert, sondern de novo in den Tränendrüsen synthetisiert wird.

SENN (125) untersuchte Blutzellen auf ihren Lysozymgehalt und erhielt folgende Werte:

Granulozyten	:	7,2 μ g L/ 10^6 Zellen
Monozyten	:	8,4 μ g L/ 10^6 Zellen
Lymphozyten	:	0,4 μ g L/ 10^6 Zellen

Andere Blutzellen zeigten keine meßbare Aktivität. Sehr hohe Lysozymkonzentrationen wurden in an polymorphkernigen Leukozyten reichen Exsudaten nach Lyse der Zellen beobachtet.

Ein ähnliches Versuchsergebnis erhielt FLANAGAN (48). Er stellte im Blut von Kaninchen einen 5-fachen Anstieg des Lysozymtiters nach Lysis von Leukozyten fest. In Erythrozyten und Thrombozyten konnte auch er keine Lysozymvorkommen nachweisen.

MYRVIK (104) konnte 1mg L/ml polymorph. Leukozyten bzw. 10 μ g L/ml Monozyten aus dicht gepackten Zellen gewinnen. Über die Lysozymfreisetzung aus Leukozyten und Gewebezellen berichten mehrere Autoren. TEW (135) et al. beobachteten einen 4-5 fachen Anstieg des Plasma-Lysozymspiegels von Kaninchen wenige Stunden nach der Stimulation durch AG-AK Reaktion, Entzündungsprozesse, Blutkoagulation oder i.v. Injektion von Bakterien. Dabei kam es zu einem deutlichen Abfall der Zahl zirkulierender Leukozyten. Nach 30-32 Stunden waren die Werte wieder normal.

HAMDY (66) erreichte Lysozymfreisetzung durch Traumen, die er am Musculus pectoralis major bei weißen Leghornküken setzte. Je stärker das Trauma, desto größer war die Freisetzung von Lysozym. Nach 5 Tagen traten wieder normale Werte auf. Durch Staphylococcus aureus und E. coli-Infektionen konnte eine Steigerung der Lysozymfreisetzung im traumatisierten Bereich von 8.7 auf 23,5 μg L/g Gewebe erreicht werden.

FINK und FINCH (47) zerstörten im Kaninchen zirkulierende Granulozyten durch Injektion von Meerschweinchen-Antikaninchengranulozytenserum. Es erfolgte ein prompter Anstieg der Lysozymaktivität mit einem Peak 1 Stunde nach der Injektion.

Ein anderes Forscherteam erzielte durch intraperitoneale Injektion von 500 ml 0.1 %iger Glykogen-Salzlösung hohe Lysozymkonzentrationen im Peritonealexsudat, die nach 24 Stunden 22 mal größer waren als im Serum. Bei subcutaner Injektion ergab sich ein Anstieg auf das 49 - 112fache der Serumwerte. Auch diese Erhöhung erklärt sich aus der Lysozymfreisetzung von Leukozyten im Entzündungsgebiet (77, 135).

Eine Gruppe um COHN (57) machte die Entdeckung, daß reine Zellkulturen von Mäuse - Peritoneal - Makrophagen und menschlichen Monozyten in vitro große Mengen von Lysozym synthetisieren und sezernieren. Die Sekretion in der Kultur bewirkte einen 4 - 20fachen Anstieg des Gesamtlysozyms in 3 Stunden, 75 - 95 % davon erschienen im Medium. Es bestand eine lineare Beziehung zwischen Lysozymsekretion und der Zahl der stimulierten Makrophagen bzw. menschlichen Monozyten. Die Produktionsrate blieb bemerkenswert konstant für alle Zelltypen und Kulturbedingungen. Sie war optimal bei relativ niedrigen Serumwerten, konnte aber auch im serumfreien Medium aufrechterhalten werden.

Derselbe Autor untersuchte beim Kaninchen ölinduzierte peritoneale Makrophagen, normale alveoläre und BCG-induzierte alveoläre Makrophagen. Sie wiesen in dieser Reihenfolge zunehmenden Lysozymgehalt auf. Fraktionierung der BCG-induzierten Makrophagen durch verschiedenes Zentrifugieren zeigte, daß 60 - 80 % der Enzyme, auch Lysozym, in einer Fraktion lokalisiert waren, die bei 15 000 g sedimentierte. Mechanische Zerstörung dieser Granula setzte 86 - 95 % der Enzyme in löslicher Form frei. Ebenso konnten diese Makrophagen einen großen Teil des intrazellulären Lysozyms während der Phagozytose ins Medium abgeben (26, 27).

2.5 DIE BEDEUTUNG DES LYSOZYMS FÜR DEN ORGANISMUS

Über die Bedeutung des Lysozyms für den Organismus gibt es verschiedene Meinungen. Nachdem METCHNIKOFF eine Auffassung von der Körperabwehr auf mechanischem Wege durch Abwaschen, Desquamation, Sekretion und Exkretion vertreten hatte, forderte FLEMING (50) eine Korrektur dieses Standpunktes. Er argumentierte: "Die weite Verbreitung legt nahe, daß Lysozym eine der frühesten Schutzfunktionen für die Zelle gegen das Eindringen von Bakterien ist. Besonders gefährdete Organe wie Auge, Nase oder oberer Respirationstrakt sind durch höhere Konzentrationen besser geschützt. Der praktisch ohne Blutversorgung versehene Knorpel hat eine hohe Lysozymkonzentration als zweiten Schutzwall. Das Ei besitzt Lysozym als einzigen Schutz außer dem mangelhaften durch die Schale."

Aber auch diese Meinung blieb nicht unwidersprochen. MEYER und HAHNEL (97) hielten gerade das Vorkommen von Lysozym in so verschiedenen Geweben für einen Hinweis dafür, daß seine Funktion in erster Linie eine metabolische sei (Depolymerisation, Hydrolyse), seine Rolle in der Körperabwehr wahrscheinlich nur auf Zufall beruhe.

Nach dem heutigen Stand der Kenntnisse kann man sagen, daß sowohl die Schutzfunktion als auch die metabolische Aufgabe wichtig sind und beide Bereiche sogar zusammenwirken. Auf der einen Seite ist die Lysozymwirkung auf grampositive und in Verbindung mit dem Antikörper-Komplement-System des Serums auch auf gramnegative Keime erwiesen, auf der anderen Seite greift Lysozym durch seine Wechselwirkung mit biologisch aktiven Substanzen in das metabolische Geschehen des Organismus ein. Auch wenn zu diesem Zeitpunkt noch viele wichtigen Zusammenhänge unklar bleiben, muß man dem Lysozym doch mit Sicherheit eine wichtige Rolle bei der Regulierung einiger Abwehrprozesse des Körpers zugestehen.

2.6. CHEMISCHE STRUKTUR

Strukturstudien sind vor allem an Hühnereiweiß-Lysozym durchgeführt worden. Insbesondere mittels Röntgenstrahlen und Aminosäurebestimmung weiß man heute, daß es sich bei Lysozym um eine einzige Polypeptidkette handelt, die 129 Aminosäurereste enthält.

Die Faltung der Polypeptidkette wird durch 4 S-S Brücken von Cystinresten aufrechterhalten. Diese Disulfidbrücken verbinden die Aminosäurereste 6-127, 30-115, 64-80 und 76-94, wobei sich die beiden erstgenannten spiegelbildlich zu Nummer 3 und 4 verhalten (12, 83). Die Brücke zwischen 6 und 127 kann bei Hühnereiweiß ohne Aktivitätsverlust gesprengt werden (79,80).

Das Lysozymmolekül ist ungefähr ellipsoid mit den Abmessungen $45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ (11,12). Die Angaben über den Anteil an α -Helix variieren von 29% (83) bis maximal 42% (11). BLAKE (12) bezeichnet 3 Abschnitte mit α -Helix Struktur: AS 5-15, 24-34 und 88-96. Sie zeigen an einigen Stellen eine Drehung der klassischen α -Helix. Der Betrag der Drehung wechselt. Im Abschnitt 5-15 ist er gering, beträchtlich dagegen zwischen 24 und 34.

Neben der α -Helix kommen auch noch andere Strukturformen vor. KARLSON (83) erwähnt ein Stück Faltblattstruktur von 2x5 Aminosäuren. Zwischen den Resten 35-80 ist, die Faltung sehr komplex, die Reste 41-54 formen in diesem Bereich eine fast geschlossene Schlinge (11). Außer langen Strecken mit ziemlich unregelmäßiger Anordnung findet man an manchen Stellen auch eine gestreckte Form der Polypeptidkette (12).

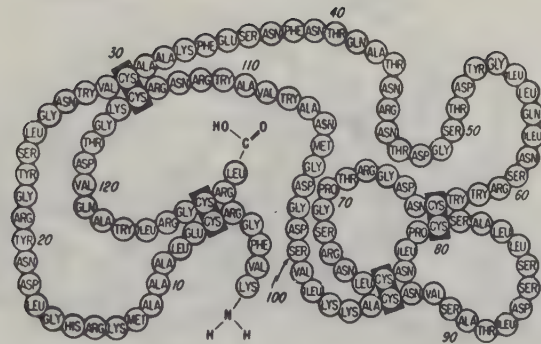


Abb 1: Die Sequenz der Aminosäurereste in Hühnereiweiß - Lysozym (nach Canfield und Liu).

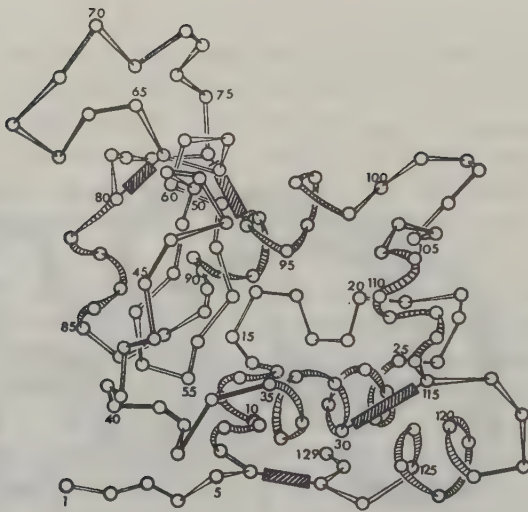


Abb. 2: Schematische Zeichnung der Kettenbildung im Lysozym-Molekül (nach W. C. Braggs).

Eine tiefe Kluft in der Enzymoberfläche teilt das Molekül in zwei Teile von deutlich unterschiedlichem Charakter. Der eine hat einen beträchtlichen Teil nicht-polarer Seitenketten, die zusammen einen hydrophoben Kern bilden. Dieser stellt wahrscheinlich einen Grund für die große strukturelle Stabilität dar (12). In diesem Gebiet liegt auch die Seitenkette von Glu 35 in der Nähe des Bodens der Kluft. Seine nächsten Nachbarn sind Ala 110, Glu 57 und Try 108 (13).

Der andere Teil hat relativ wenig hydrophobe Gruppen, hier spielen H-Bindungen anscheinend eine wichtige Rolle. Auf dieser Seite befindet sich Asp 52, das in ein komplexes Netz von H-Bindungen einbezogen ist, welches Asn 46, Ser 50 und Asn 59 beinhaltet (12,13).

Dieses Asp 52 bildet mit dem gegenüberliegenden Glu 35 das aktive Zentrum, von dem das Substrat aufgenommen wird. Dabei verlagert sich ein Teil der Peptidkette. Ein Kohlehydratring wird aus der Sesselform in eine weitgehend ebene Form gedrängt. Die Energie dazu wird von anderen Nebenvalenzbindungen geliefert. Durch diese Konformationsänderung wird die Spaltung einer C - O - C Bindung energetisch begünstigt. Als weitere Schritte laufen nach KARLSON (83) ab:

- 1) Von der COOH-Gruppe des Glu 35 tritt H^+ an den Glykosidsauerstoff.
- 2) Die Bindung wird gelöst - ein Carboniumion bleibt zurück. Es wird durch die COO-Gruppe von Asp 52 stabilisiert.
- 3) Nachdem Bruchstück 1 abdissoziiert ist, tritt ein Wassermolekül an das Carboniumion heran. OH^- wird angelagert und die Hydrolyse ist vollzogen. Bruchstück 2 dissoziiert ab.

Die große Mehrzahl der nicht-polaren Seitenketten liegt wie erwähnt im Inneren des Moleküls, allerdings nicht gleich verteilt. Zwischen den Resten 38-55 befinden sich keine Seitenketten (12). Darüberhinaus scheint das Molekül aber einen hydrophoben Dorn zu besitzen, der hauptsächlich aus den 6 Tryptophan-Seitenketten besteht. Drei davon, Try 62, 63 und 123 treten über die Moleküloberfläche hervor. Ähnliches Verhalten zeigen auch Val 2, Phe 3, Phe 34, Leu 17 und Leu 75 (11). Ebenfalls außen liegen die Lysin- und Argininseitenketten (11). Dagegen scheinen die Teile des Moleküls, die am besten vom Kontakt mit umgebender Flüssigkeit abgeschirmt sind, Ser 91 und Glu 57 einzuschließen. Auch Asp 58 liegt im Inneren des Moleküls (11). Die Seitengruppe von Rest 66 zeigt ebenfalls nach innen und ist in H-Brücken zu anderen Seitenketten verwickelt. Sie ist jedoch wahrscheinlich für H_2O Moleküle an der Oberfläche erreichbar (12).

Die hier angeführten Einzelheiten gelten exakt nur für das Lysozym aus Hühnereiweiß. Die verschiedenen Lysozyme haben zwar alle dieselbe biologische Wirkung, unterscheiden sich aber in Struktur und spezifischer Aktivität. Alle bisher studierten menschlichen Lysozyme zeigten dasselbe chromatographische Verhalten und dieselbe Aminosäurezusammensetzung (7, 80). Für tierische Lysozyme gilt das nicht. So sind zum Beispiel die Lysozyme aus Hühnerlunge und -eiweiß verschieden (80). CANFIELD (20) und JOLLÈS (80) zeigten durch AS-Analysen Strukturunterschiede zwischen Humanlysozym und solchem aus Hühnereiweiß. Letztgenannter Autor wies gleiches für Humanlysozym, 4 Lysozyme aus Vogeleiern, 2 von Hunden, je 1 aus Kaninchenmilz, Hühnerlunge und Nichtvertebraten (*Nephtys hombergi*) nach (80). EITENMILLER (39) fand das Lysozym aus Kuhmilch verschieden von dem aus Humanmilch oder Hühnereiweiß.

Lysozym aus Pavianmilch (Molekulargewicht 15 000) differiert trotz allgemeiner Ähnlichkeit von Humanmilch- und Hühnereiweiß-Lysozym im Histidin- und Methionin-gehalt. Letzteres war nach BUSS (18) beim Pavian abwesend, es wird aber für die Wirkung von Lysozym aus Hühnereiweiß für essentiell gehalten.

Auch die Anzahl der Aminosäuren ist bei den einzelnen Lysozymen verschieden (79).

Hühnereiweiß-Lysozym	: 129	Aminosäurereste
Enteneiweiß-Lysozym	: 125 ± 3	"
Mensch,Tränen-Lysozym	: 123 ± 8	"
Mensch,Milch-Lysozym	: 123 ± 8	"
Gänseeiweiß -Lysozym	: 129 ± 5	"

Von besonderem Interesse sind auch bestimmte Aminosäurereste.

- 1.) Histidinrest. Er scheint bei der Ente keine Rolle zu spielen, da er bei voll aktivem Entenlysozym fehlt (80).
- 2.) Tryptophan. Hühnereiweiß-Lysozym enthält 6 Try-Reste/Molekül. JOLLÈS (80) änderte Rest 108 und 111. Das Lysozym behielt die volle Wirkung. Nach Änderung aller 6 Reste war das Enzym inaktiv.
- 3.) Cystin. Es steht in enger Beziehung zur Hitze-stabilität.
 - a) Hühner- und Enten-Lysozym mit 4 Resten/Molekül sind ziemlich stabil bei saurem und neutralem pH nach Erhitzung auf 100° C für 1 Minute.
 - b) Menschen-Lysozym mit 3 Resten ist etwas empfindlicher.
 - c) Gänse-Lysozym mit 2 Cystinresten/Molekül hat seine Stabilität verloren, es ist schon bei 20° C weniger stabil als die anderen (79, 80).

2.7. PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN

Molekulargewicht:

Eine russische Gruppe gibt es mit 14 800 an (114). CANFIELD (20) berechnete es basierend auf der Strukturbestimmung auf 14 307.

Löslichkeit:

Lysozym ist löslich in Wasser und normaler Salzlösung, unlöslich in alkalischer Lösung wie Alkohol und Aceton. SCHUMACHER (122) nennt als Minimum der Löslichkeit pH 10,6 - 10,9 bei 15°C.

Haltbarkeit:

Es ist trocken bei Labortemperatur oder im Kühlschrank über Jahre haltbar und bleibt dabei steril (50, 122). Lysozymhaltiges Material kann mehrere Monate in Chloroform oder Toluol aufbewahrt werden, da sie Lysozym nicht zerstören (50).

Filtrierbarkeit:

Lysozym ist nicht dialysierbar und nicht filtrierbar durch Kollodiummembran oder Pergament. Auf Grund seines geringen Molekulargewichtes durchdringt es die Wand eines Cellophanschlauches (122). Porcelain-Filter (Berkfeld-Filter), Filterpapier und Baumwollfilter können eine beträchtliche Menge Lysozym absorbieren. Wenn ihre Kapazität erschöpft ist, bieten sie kein Hindernis mehr, und die Substanz gelangt wie unfiltriert hindurch. Tierkohle kann Lysozym aus Flüssigkeit entfernen. Sie wurde von FLEMING (50) mit einer 1000-fachen Lysozymverdünnung von Tränen zusammengebracht und nach 2 Stunden zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit war Lysozym-frei.

WOLFF (4) berichtete auch über leichte Absorbierbarkeit an Porzellanerde, Silikonsäure und Ton.

Temperaturverhalten:

Tiefe Temperaturen schaden nicht. 70°C werden 1/2 Stunde vertragen. Bei 58°C über unbestimmte Zeit fand BERNHEIM (122) keinen Verlust der Aktivität. Für die komplette Zerstörung genügen wenige Minuten Kochen.

Es ist jedoch ein Charakteristikum für tierische Lysozyme, daß sie im sauren Medium relativ hitzestabil sind, nicht jedoch in alkalischem. HARTSELL (122) wies Thermostabilität (100°C während 30 Minuten) bei pH 4 durch 2%ige Essigsäure nach. MEYER (95) nahm ebenfalls 2%ige Essigsäure und erhitzte auf 100°C über 45 Minuten ohne Aktivitätsverlust. Bei neutralem pH ging während dieser Zeit alle lytische Wirkung verloren, bei pH 9 war schon nach 5 Minuten und 100°C das meiste Lysozym inaktiviert. Auch GREENWALD (60) beschreibt die Hitzestabilität im sauren Medium. In alkalischem erhielt er beim Kochen 80% Wirkungsverlust. Auch in der Milch beobachtete CHANDAN (24) bei niedrigem pH größere Hitzeresistenz von Lysozym, bei pH 9 trat vollständiger Aktivitätsverlust ein. Frauenmilch-Lysozym war widerstandsfähiger als Kuhmilch-Lysozym, nach den Untersuchungen von KIMURA (85) aber bei 30, 40, 60 und 80°C weniger stabil als Hühner-eiweiß-Lysozym.

Bei Frauenmilch war die Lysozymaktivität sehr gut durch Einfrieren zu erhalten, Auftauen und Wiedereinfrieren setzte sie jedoch herab (24).

Lysozym und Strahlung:

a) UV-Licht

Ferrinis (45) Untersuchungen zeigten, daß UV-Licht auf die Cystin- und Histidinreste einwirkt. Er sieht einen Zusammenhang zwischen enzymatischer Inaktivierung und Histidinverlust. SCHUMACHER (122) machte die Beobachtung, daß Lysozym gegen UV-Licht umso empfindlicher ist, je

verdünnter es vorliegt und desto weniger leicht angegriffen wird, je mehr Begleiteiweiß zur Verfügung steht. Da er keine Zerstörung von Hühnereiweiß-Lysozym durch die Sonne und keine in ungesäuerter Lösung durch UV-Licht nachweisen konnte, schließt er daraus, daß nur freies Lysozym leicht angegriffen wird. SHUGAR (128) bestrahlte Lysozym mit einer Niederdruck-, GLAD (54) mit einer Hochdruck-Quecksilberlampe. Beide fanden Inaktivierung durch UV-Licht als Funktion 1. Ordnung in Bezug auf die Bestrahlungszeit.

b) Röntgenstrahlen

KARTASOV (84) setzte 2 Gruppen laktierender Schafe einer Bestrahlung mit 1200 R aus. Gruppe I erhielt Schutzstoffe (Unitol, Cystin, Meksamin), die andere nicht. Gruppe II verendete nach 13-15 Tagen. Bei beiden Gruppen war der Keimgehalt der Milch stark erhöht und die bakterizide Wirkung herabgesetzt. Eine III. Gruppe erhielt eine 600 R starke Bestrahlung während der Trächtigkeit. Alle 3 Gruppen wiesen nach der Bestrahlung einen stark verringerten Lysozymgehalt auf.

Eine Gruppe um EITENMILLER (38) stellte fest, daß bei steigenden Dosen bis 120 Krad die Lysozymaktivierung exponential fällt. In einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ war das Enzym empfindlicher als bei 500 $\mu\text{g/ml}$. Lysozym der Kuhmilch zeigte die größte Empfindlichkeit, das aus Humanmilch die geringste. Hühnereiweiß-Lysozym lag dazwischen. Nach Untersuchungen von STEVENS (133) scheinen Lysozymaggregate das vorherrschende Produkt einer Röntgenbestrahlung dieses Enzyms zu sein.

Fluoreszenzverhalten:

Lysozym zeigt ein Fluoreszenzspektrum mit einem Maximum bei 340 nm. In Anwesenheit starker Inhibitoren verschiebt sich das Maximum auf 330 nm. Schwache Inhibitoren vermindern nur die Intensität der Emission (127).

Kristallisation:

Lysozym ist heute kristallin im Handel. Die Kristallform richtet sich nach pH und Natur des Lysozymsalzes. Gewöhnlich sind die Kristalle farblos und tetragonal (122). BLAKE (12) gibt die Größe von Kristallen, die bei pH 4,7 entstanden, mit $a=b=79.1 \text{ \AA}$, $c=37.9 \text{ \AA}$ an.

ALDERTON und FEVOLD (5) bezeichnen also optimale Bedingungen für die Kristallisation:

- 1.) Isoelektrischer Bereich pH 9,5-11, weil hier eine deutlich geringere Löslichkeit des kristallinen Produkts vorliegt.
- 2.) 5% Salzkonzentration (nach ihren Angaben kristallisiert Lysozym dabei über einen pH Bereich von 3 bis 11.
- 3.) Temperatur 4°C .

Sie gewannen Kristalle aus Chlorid, Jodid, Bromid, Nitrat und Bicarbonat. Versuche der Kristallisation von anderen Salzen scheiterten.

Der isoelektrische Punkt wird von GREENWALD (60) mit 10,4 angegeben. Damit hat Lysozym eine starke Elektropositivität, während die Zellwand seines Substrates *Mikrococcus lysodeikticus* hauptsächlich negativ sein soll. Diese vorteilhafte elektrostatische Wechselwirkung wird verringert, wenn die Ionenstärke des Mediums steigt. Das kann erklären, warum eine höhere Ionenstärke hemmend wirkt.

Als Erklärung für die geringe oder fehlende Aktivität von Lysozym bei Fehlen von Salz käme folgende Erklärung in Frage (DAVIES 31):

Es gibt eine produktive und eine unproduktive elektrostatische Bindung. Bei der letzteren ist der glykosidische Teil der Zellwand entfernt vom aktiven Teil auf der Außenseite des Moleküls gelagert. Die Balance zwischen diesen Formen soll stark von der Ionenstärke abhängen. Diese

Ionenstärke für maximale Lysis liegt bei niedrigem pH höher. Bei steigendem pH nimmt die Ladung von Lysozym ab, deshalb hat hier Erhöhung der Ionenstärke stärkeren Hemmeffekt als bei etwa neutralem pH. Als optimale Bedingungen für Lysozymlyse gelten 45°C , pH 6-7 und 0,5-1% Salzkonzentration (122).

2.8. BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

Lysozym gehört zur unspezifischen Infektabwehr. Es ist ein zellulärer Faktor, dessen Wirkung abhängig ist vom Vorhandensein spezifischer Antikörper und/oder unspezifischer humoraler Faktoren wie Opsonin, Komplement und Properdin (16). Seine Wirkung kann durch aktive Immunisierung nicht gesteigert werden.

Wirkung auf die Zellwand:

Lysozym bewirkt Lyse bei Bakterien durch Depolymerisierung von Mucopolysacchariden der bakteriellen Zellwand. Die lytische Wirkung entsteht durch eine enzymatische Hydrolyse von β 1-4 glykosidischen Bindungen im Peptidoglykan (32, 100). Das Substrat ist in grampositiven und gramnegativen Bakterien vorhanden. Insbesondere grampositive können völlig aufgelöst werden.

Eine wichtige Ausnahme ist *Staphylococcus aureus*, der selbst Lysozym produziert. WORK (142) macht das Vorhandensein von O-acetyl-Gruppen für die Resistenz von *Staphylococcus aureus* gegen sein Lysozym verantwortlich. Dieser Keim kann durch ein Lysozym der *Chalaropsis* Spezies angegriffen werden, das zusätzlich ein β 1,4-N, 6-O diacetylmuramidase-Aktivität besitzt (120).

Bei gramnegativen Bakterien bilden die oberflächlichen Lipoprotein-Lipopolysaccharidschichten eine Permeabilitäts-Barriere. Sie verbergen das Substrat und machen es für Lysozym unerreichbar. Damit sind diese Bakterien unter natürlichen Bedingungen resistent (100, 142). Durch entsprechende Vorbehandlung (Frieren-Auftauen, osmotischer Schock, Zusatz von EDTA, Aceton, n-Butanol, Hitze, niedriger pH) kann die funktionelle Vollwertigkeit der Lipoprotein-

Lipopolysaccaridschichten angegriffen und eine bakteriolytische Wirkung ermöglicht werden (42, 100, 108).

Unter solchen Bedingungen wurden gelöst:

Brucellen, Klebsiellen, Pasteurellen, Neisserien, Shigellen, Salmonellen (102), Escherichiakeime (10, 42), Pseudomonaden (137), Vibrionen (46, 141), Leptospiren (6), Borreliakeime (106).

Im Organismus werden gramnegative Bakterien durch das Antikörper-Komplement-System im Serum angegriffen und getötet. Einige Autoren stellten eine Steigerung dieses Vorgangs durch Lysozym fest. Andere konnten das nicht bestätigen.

Genauere Studien wurden von WILSON (139) und FEINGOLD (42) mit radioaktiv markierten E-coli Stämmen vorgenommen.

WILSON (139) arbeitete mit 3 Systemen:

1.) Antikörper + Lysozym

Es kam praktisch zu keiner Freisetzung von ^{32}P an den markierten Bakterien, die E-coli-Zellen waren morphologisch normal.

2.) Antikörper + Komplement

26%-30% Freisetzung von ^{32}P . Die Zellen erschienen als Stäbchen, die Ultrastruktur zeigte Schwellung und Glätten der sonst gefalteten äußeren Zellwandschicht. Die cytoplasmatische Membran war zerstört und die innere Zellstruktur in Unordnung.

3.) Antikörper + Komplement + Lysozym

Dabei trat ein verdoppelter Prozentsatz der Freisetzung von ^{32}P auf und es zeigten sich Spheroplast Formationen. Die Zellwand besaß keine einheitliche Struktur mehr. Ihre innere Schicht war dicker oder verschwunden.

Auch bei FEINGOLD (42) lieferte vollständiges menschliches Serum über 99 % getötete Zellen und änderte die Stäbchenform in Spheroplasten. Lysozym-freies Serum ergab getötete Stäbchen und wenig freigesetzte Radioaktivität.

Der Ablauf der Serumwirkung wird im Folgenden beschrieben. Dabei bedeutet B Bakterienzelle, B^L lysozymempfindliche Bakterienzelle und B^o getötete Bakterienzelle. S steht für Spheroplast und "S" für "Schattenzelle".

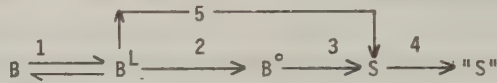


Abb. 4 Schema der Wirkung des Serums auf Bakterien nach Davis (33).

Wirkt Serum kurzfristig auf die Bakterien ein, ruft das eine Zwischenform der Bakterienzelle hervor (Reaktion 1). Das Bakterium wird lysozymempfindlich. Der Vorgang wird durch das Antikörper-Komplement-System vermittelt und ist reversibel.

In der Reaktion 2 wird die Bakterienzelle nach längerem Aufenthalt im Serum durch die Serumfaktoren getötet. Wann diese Möglichkeit eintritt, ist nicht genau bekannt. Die Reaktionen 3 und 5 sind das alleinige Ergebnis der Lysozymtätigkeit. Dabei wurde ein Bedarf an Serum ausgeschlossen. In der Reaktion 3 werden die Mukopeptide der Bakterienzelle vom Lysozym angegriffen und zurück bleibt ein Spheroplast. Dieser kann sich wiederum in eine Schattenzelle umwandeln, indem durch Risse in der äußeren Membran Zellbestandteile verloren gehen (Reaktion 4). Die Ursache dafür dürfte die eigene Instabilität der von Lysozym angegriffenen Bakterienzellwände sein.

Reaktion 5 braucht eine höhere Lysozymkonzentration, um mit merklicher Geschwindigkeit abzulaufen. Deshalb ist dieser Weg eventuell bedeutsam für das Töten von Bakterien nach Phagozytose, da die Leukozyten hohe Lysozymkonzentrationen haben, während die in Serum und Plasma gering sind.

Diese Fähigkeit Spheroplasten bzw. Protoplasten zu bilden, d.h. Bakterienzellwände abzubauen, ist von besonderem Interesse für das Studium von Bau und Funktion der Bakterienzellwand.

MIZUGUCHI (101) wandte sie bei Mycobakterien an. MUSCHEL (102) wandelte E.-coli und S-typhosa "Mrs S" bzw. S-typhosa H 901 durch Serum bzw. Antikörper-Komplement-System Behandlung und anschließender Lysozymzugabe in Protoplasten um. Eine Gruppe um FLECK (49) untersuchte Penicillin-induzierte Filamente von Proteus vulgaris P 18 elektronenmikroskopisch und chemisch. Sie zeigten einen 5-schichtigen Wall und einen Anstieg der Total-Lipid Fraktion. Lysozym verminderte die Schichten auf 3 und wandelte die Zellen in Spheroplasten um. Lysozym hatte auf normale Proteus vulgaris Zellen keinen Einfluß, hellte aber eine Suspension Penicillin-induzierter Filamente auf 40 % des ursprünglichen Trübungswertes auf.

BIRDSELL (10) studierte mit Hilfe der Spheroplastenbildung den Membranaufbau bei E.-coli. (Abb.5).

Physiologisch junge Zellen der späten lag- oder der frühen Exponentialphase wurden mit 0.5 M Saccharose bei pH 7-9 plasmolytisch. Nach Lysozymbehandlung zeigte sich eine osmotische Empfindlichkeit. Eine 1:1 Verdünnung war notwendig, um die Zellen von der Stäbchenform in Spheroplasten umzuwandeln. Nach Zugabe von EDTA entstanden Spheroplasten ohne Plasmavakuole, die ebenfalls osmotisch empfindlich waren.

Einige Autoren weisen darauf hin, daß sich Lysozym bei derartig präparierten osmotisch empfindlichen Zellen mit ribosomalen Untereinheiten verbinden bzw. einen Komplex freier Ribosomen bilden kann (34, 110).

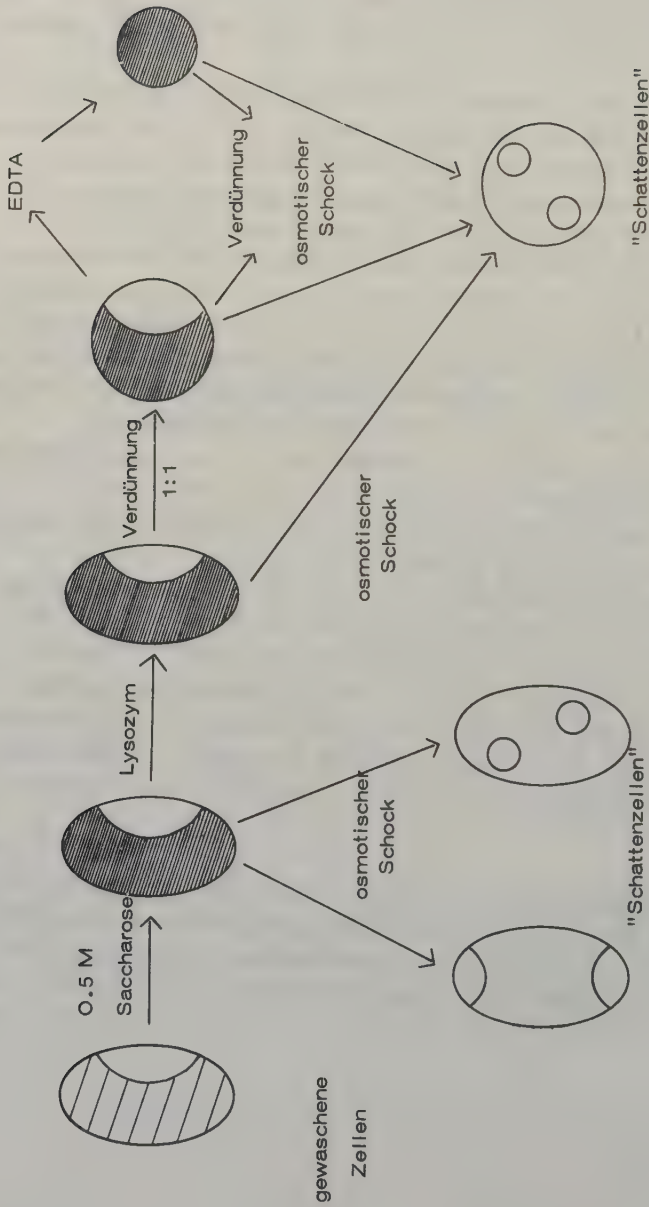


Abb. 5 Schema der Spheroplastenbildung bei *E. coli* nach Birdsell (10)

Wirkung auf Sporen

Die frühere Meinung, Lysozym sei gegen Sporen wirkungslos und löse nur vegetative Formen gewisser Sporenbildner auf (51), mußte revidiert werden.

SUZUKI (134) setzte Sporensuspensionen von *Bacillus megaterium* ATCC 9885 1,5 µg/ml Lysozym in Phosphatpuffer von pH 7,6 aus. Sie zeigte eine Reduktion von 88% der optischen Dichte innerhalb 30 Minuten. Die Mantelstrukturen gingen dabei verloren und der Zentralkörper lysierte. Die Lebensfähigkeit der Sporen war auf weniger als 10% des ursprünglichen Wertes in 10 Minuten reduziert. Papain und Eialbumin hatten, wahrscheinlich aufgrund ihres Lysozymgehaltes, eine ähnliche Wirksamkeit.

Andere Untersuchungen führte ADAMS (1) an Sporen von *Clostridium perfringens* Typ A durch. Diese Sporen wiesen in NaCl-Lysozym Lösung einen nur geringen Prozentsatz an Sprossung auf. In Anwesenheit von Na₄ EDTA dagegen trat fast vollständige Keimung in 5-24 Stunden ein.

Wirkung auf Bakterien

Schon FLEMING (51) zeigte, daß die verschiedenen Körperflüssigkeiten unterschiedliche lytische Kraft gegen einige Bakterien im Körper haben. Er fand Tränen gegen *Mikrococcus lysodeikticus* am stärksten wirksam, gegen andere Kokken aber schwächer als Sputum oder Synovia. Bei hoher Lysozymkonzentration und Körpertemperatur wurde *Mikrococcus lysodeikticus* von Tränen in 30 Sekunden gelöst. Eine andere interessante Beobachtung von FLEMING (51) bestand darin, daß die bakterizide Kraft von Lysozym nach Lösung von 30 Mill. Kokken/cm³ um das 4-fache erhöht war.

Außer *Mikrococcus lysodeikticus* erwiesen sich noch folgende andere Bakterienarten als Lysozym-empfindlich:
Von *Sarcina flava* wurde durch Lysozym ein Teil der Zellwand gelöst (75), bei anderen empfindlichen *Sarcina*-

Stämmen wurden reduzierende Zucker aus der Mukoidfraktion freigesetzt (96).

Lactobacillus fermenti war am stärksten empfindlich in der Exponentialphase des Wachstums. Zellen anderer Phasen benötigten für die Lysis durch Lysozym eine vorherige Inkubation mit Trypsin (105).

Untersuchungen über *Streptococcus faecium* und *Streptococcus faecalis* zeigten nach einer Lysozymbehandlung eine Hydrolyse der Zellwände (94), Induktion von L-Formen (86) und die Freisetzung von N-acetylhexosamin als Beweis für die zerstörte Zellwand (93).

Die Mehrzahl infektiöser *Chlamydia trachomatis*-Partikel, die in Hinblick auf ihre Zellwandbeschaffenheit eine enge Beziehung zu Bakterien aufweisen, konnte durch eine Lysozymkonzentration von 2000 $\mu\text{g/ml}$ nicht inaktiviert werden, es trat aber eine deutliche Verminderung der Infektiosität auf (87).

SCHUMACHER (122) stellte nach Lysozymzugabe vor der Lösung der peripheren Mukoide eine Verminderung der Farbstoffaffinität fest, die sich als Verlust der Grampositivität oder einer veränderten Giemsa- bzw. Feulgenfärbung ausdrückte. Er wies auf die Wichtigkeit dieser Tatsache bei der Deutung von Bakterienpräparaten aus Bindehautsack, Vagina, Magen und Mundhöhle hin.

In einer Konzentration von 0.012 % und darüber reduzierte Lysozym die Zahl der Gesamtbakterien und die Anzahl der coliformen Bakterien in der Kuhmilch (43).

Das Wachstum von *Streptococcus cremoris* nahm dagegen in laktosehaltigem Material bei einer Lysozym-Konzentration von 0.000025 % zu (3).

Wirkung auf Viren

Vaccine- und Herpesvirus konnten durch Lysozym inaktiviert werden (SCHUMACHER, 122, FERRARI, 44).

SCHUMACHER und CASELLI (122) wiesen eine zeitweilige Inaktivierung des Rous-Sarkoma Virus nach. Das Tumorstadium blieb intracorneal aus, wenn das Virus vorher mit Lysozym versetzt worden war.

Dieselben Autoren (122) geben an, daß sich einige Viren (Herpes, Maul- und Klauenseuche, Poliomyelitis) nicht auf der Chorioallantoismembran züchten lassen, solange diese lysozymhaltig ist.

In vitro wurde eine Inaktivierung von Influenza- und Poliomyelitis-Viren durch Nasenschleim gefunden. Mit reinem Lysozym konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden (BURNET, FRANCIS, COLUCCI / JACONO, HOFMANN, 122).

Eine weitere Beobachtung unter in vitro-Bedingungen gibt FERRARI (44) an. Er beschreibt Präzipitation von Bakteriophagen durch Lysozym.

2.9. RESISTENZ

FLEMING (51) fand Anzeichen für eine mögliche Resistenz bei einer Versuchsanordnung zum Nachweis der Diffusion durch Agar. Er stanzt Platten in der Mitte aus und füllte die Löcher mit lysozymhaltigem Material. Dann übergießt er die Platten mit Agar, beimpfte sie mit *Mikrococcus lysodeikticus* und bebrütete sie. Nach 24 Stunden trat überall Wachstum des Keimes auf mit Ausnahme des Bereichs über dem lysozymhaltigen Material und eines Umkreises von etwa einem Zentimeter, der durch Diffusion ebenfalls lysozymhaltig geworden war. Nach langer Inkubation erschienen auch in der Zone der ursprünglich totalen Hemmung eine Anzahl Mikroben, die mit dem Ausgangsmaterial morphologisch und kulturell identisch waren. Diese zeigten sich nicht nur resistenter gegen die bestimmte Flüssigkeit oder das Gewebe, in dem sie gewachsen waren, sondern auch gegen alle anderen lysozymhaltigen Substanzen wie zum Beispiel menschliches Blut oder Leukozyten. Die Resistenz blieb bei regelmäßiger Oberimpfung im Abstand von 2-3 Wochen unvermindert über 9 Monate erhalten.

In einem anderen Versuch (51) war *Mikrococcus lysodeikticus* nach 91 wöchigem Aufenthalt in Eiweiß nur noch in einer Lysozymverdünnung von 1:800 löslich, während der Keim vorher in einer Verdünnung von 1:64 000 gelöst werden konnte.

RIDDLEY (51) gab Staphylokokken zu in Tränenflüssigkeit gelöstem Lysozym und kultivierte die Überlebenden. Mit diesem Material erzeugte er, intracorneal injiziert, eine Keratitis beim Kaninchen, was mit dem Ausgangsmaterial nicht möglich war.

Ein durch Züchten in wachsenden Lysozymkonzentrationen an Eiweiß adaptierter Stamm von *Mikrococcus lysodeikticus* war gegen Ficin-Lysozym unempfindlich und benötigte 16-fach Eiweißkonzentration zur vollkommenen Lysis (98).

2.10. ANTIGENE EIGENSCHAFTEN

Die antigenen Eigenschaften der Lysozyme sind durch den Nachweis von Lysozymantikörpern im Kaninchen nachgewiesen worden. YOUNG (144) zeigte, daß Antikörper von Kaninchen, die mit kristallinem Lysozym sensibilisiert worden waren, mit reduziertem und carboxymethyliertem Lysozym genauso reagierten wie mit unverändertem Lysozym. Der Titer gegenüber carboxymethyliertem Lysozym war dabei 1/10 des Titers gegenüber Lysozym und nahm mit der Zeit und nach wiederholten Injektionen ab, während der Titer gegenüber Lysozym relativ konstant blieb.

Untersuchungen über die Immunantwort gegenüber Lysozym oder carboxymethyliertem Lysozym in Mäusen, die vorher gegenüber dem Antigen tolerant gemacht wurden, wiesen eine starke Hemmung oder völlige Aufhebung der Antikörper-Antwort auf. Lysozym-tolerante Tiere reagierten normal auf ein nicht verwandtes Antigen, wie z. B. Tabakmosaikvirus (123).

2.11. WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN LYSOZYM UND ANDEREN SUBSTANZEN

Von vielen Autoren ist über fördernde oder hemmende Wirkung bestimmter Substanzen auf Lysozym berichtet worden, ohne daß in vielen Fällen eine praktische Bedeutung für bestimmte Vorgänge im Körper daraus abgeleitet werden konnte. Trotzdem sollen einige Beispiele genannt werden.

Als fördernd werden beschrieben:

Casein, erhitzte Frauenmilch, 1:10 verdünnte Kuhmilch, gesäuerte Pulvermilch (16), Histone, Protamine und Peptone (82). SHUGAR (128) berichtet über schwachen Schutz von Arginin gegen Inaktivierung von Lysozym bei UV-Bestrahlung. EITENMILLER (38) fand bei Cystein und t-Butanol eine Schutzwirkung gegen die Inaktivierung von Lysozym nach γ -Bestrahlung. Tyrosin und Thyronin-Analoga wirkten als Inhibitoren gegen photodynamische Inaktivierung des Lysozyms=Beleuchtung in Anwesenheit sensibilisierender Farbstoffe.

Zu den hemmenden Faktoren gehören:

Riboflavin -5'-phosphat, Eosin und Methylenblau (54). Nach KERBY und BARNETT (122) soll Cortison oral und i.m. in hohen Dosen den Lysozymgehalt von Leukozyten senken, dem wird aber von HIRSCH (72) widersprochen. Hemmend sollen ferner wirken: Urin, Liquor cerebrospinalis, Rinder- und Schweinegalle (122), Gold, Silber, Kaliumjodid, Kupferoxid, Alkali und Peroxide (95). Ozon hat nach in vivo Untersuchungen von HOLZMAN (73) an Kaninchen eine der Konzentration und Einwirkungsdauer proportionale Hemmwirkung durch Oxydation der Sulfhydrylgruppen. Die Erholungsrate nach dem Absetzen verlief linear. Belegt ist auch die Hemmung durch sulfurierte Hyaluronsäuren und Heparin (130), die Art der Hemmung durch Heparin ist nach ECKERT (37) kompetitiver Natur, ebenso die durch N-acetyl-glucosamin und sein Dimer Chitobiose (11).

2.12. DER NACHWEIS VON LYSOZYM

Es gibt mehrere Verfahren, um Lysozym nachzuweisen. Eine Möglichkeit besteht darin, die bakteriolytische Wirkung gegen *Mikrococcus lysodeikticus* heranzuziehen. Die Lyse der Keime wird dabei photometrisch mittels einer Eichkurve mit kristallinem Lysozym bestimmt. Diese Methode wird häufig angewandt, sie ist einfach und schnell und hat zudem den Vorteil guter Genauigkeit und Reproduzierbarkeit (16, 128, 131).

Gelegentlich wird der Lysozymnachweis auch mit anderen Keimen, wie z.B. *Sarcina lutea* oder *Staphylococcus muscae* durchgeführt. Dabei können neben dem Enzymsubstrat in der Zellwand auch andere Substrate wie Mucopolysaccharide herangezogen und eine viscosimetrische Methode der Lysozymbestimmung verwendet werden (97, 104).

Eine andere Nachweismethode ist die Plaque-Technik. Sie ist eine praktische Anwendung des Fleming'schen Diffusionsversuches, wobei als Indikator die Größe der Hemmzone des Wachstums von *Mikrococcus lysodeikticus* Keimen in der Nachbarschaft lysozymhaltigen Material dient (51, 117).

Modernere Verfahren machen sich die Möglichkeiten der Immunelektrophorese und Immunfluoreszenz zunutze, wobei der Nachweis des Lysozyms durch Fluorescein-markierte Antikörper geführt wird (7, 67, 119).

Die Isolierung von Lysozym macht durch kombinierte Verfahren der Schichtabsorption mit Carboxymethylcellulose und Säulenchromatographie keine besonderen Schwierigkeiten mehr (33, 85).

2.13. DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG

Gewissen diagnostischen Wert hat Lysozym nach bisher vorliegenden Untersuchungen bei Leukämien, Nierenerkrankungen und entzündlichen Veränderungen der Meningen. In diesen Fällen ist der Lysozymspiegel im Serum, Urin bzw. Liquor cerebrospinalis erhöht.

Deutlich wachsende Lysozymmengen wurden im Serum und Urin von zehn aufeinanderfolgenden Fällen monozytotischer und monomyelozytotischer Leukämie gefunden. Das Lysozym wurde isoliert und war identisch mit solchem aus gesundem Serum. OSSERMANN (109) schloß daraus, daß Lysozym das hauptsächliche, wenn nicht sogar das einzige Produkt proliferierender Monozyten ist.

BALAZS und ROEPKE (9) fanden bei Ratten, die mit nieren-toxischem Quecksilberchlorid behandelt worden waren, zuerst linear ansteigende Lysozymwerte. Diese waren nach 24 Stunden aber niedriger als nach der anfänglichen Steigerungsrate erwartet. Sie werteten das als Hinweis auf einen extrarenalen Abbaumechanismus, der Lysozym inaktiviert oder eliminiert, sobald es eine hohe Plasmakonzentration erreicht hat.

HANSEN (68) konnte bei Patienten ohne Nieren einen extrarenalen Abbau feststellen, der 15 % der Rate von Patienten mit intakten Nieren betrug. Bei nephrectomierten Patienten blieb der Lysozymspiegel über eine bestimmte Untersuchungsperiode konstant, was als Beweis für einen extrarenalen Abbau anzusehen ist.

DAVIDSON (30) vermutet, daß Veränderungen in den Lysozymwerten der Niere selber erst die Zerstörung und dann die Regeneration der Nierentubuli widerspiegeln.

Er gab Ratten 8 mg/Kg HgCl_2 und beobachtete 100 fachen Anstieg der Lysozymexkretion. Die höchsten Werte im Urin erschienen vor der Normalisierung der Nierenwerte und die Erholung der Nierenwerte wurde begleitet von einem ansteigenden RNS/DNS Verhältnis als Parameter für die Proteinsynthese.

Erhöhte Mengen von Lysozym im Urin wurden auch nach chronischen Infektionen (PRUDDEN) und implantierten Tumoren (PERRI und CAPPUCCINO, 112) festgestellt.

Sinken des Serumlysozyms trat nach intratestikulärer Inokulation von *Tr. pallidum* (Stamm Nichols) ein. Erst vom 7. Tag an kehrte sich diese Reaktion um, wonach ein Ansteigen über die Normalwerte zu verzeichnen war. Möglicherweise liegt die Erklärung hierfür im Verlauf der Abwehrmechanismen (115).

Regelmäßiges Auftreten von Lysozym beschreibt BRAUN (15,16) bei bakterieller Enteritis von Säuglingen, wobei das Lysozym aus Leukozyten und Läsionen der Darmschleimhaut stammt.

Das Auftreten von Begleitkonjunktividen führt SCHUMACHER (122) auf primäre Senkung des Blut-Lysozyms zurück. Nach RIDLEY (51) haben Patienten mit Keratitis und Konjunktivitis einen reduzierten Lysozymgehalt in der Tränenflüssigkeit. FINDLEY (51) stellte auch eine Beziehung zu Vitamin A fest. Er hielt Tiere in Vitamin A-Mangel-Diät. Der Ausbruch von Keratomalazie fiel nach seinen Beobachtungen mit dem Fall des Lysozymgehaltes in den Tränen zusammen. Der Ausbruch konnte durch Instillation menschlicher Tränen verhindert werden. Demnach ginge Vitamin A-Defizit mit einer Lysozymverminderung einher.

Der hohe Lysozymgehalt der Frauenmilch ist ein sehr gutes Merkmal zur Unterscheidung von anderen Milchproben (25).

Die Lysozymaktivität bzw. erhöhte Freisetzung ins Plasma gibt FLANAGAN (48) als guten Index für die Unversehrtheit der weißen Blutkörperchen an.

2.14. DER EINSATZ VON LYSOZYM IN DER THERAPIE

Lysozym wirkt i.v. nicht toxisch, ist aber i.v. oder i.p. erfolglos, da nur ein kurzzeitig gesteigerter Serumgehalt entsteht (122). Eine gewisse Bedeutung hat die lokale Applikation. Sie war schon den Römern bekannt, die Hühnereiweiß in Arzneien gegen Augenkrankheiten verwendeten (122). Bei dieser Applikationsart werden hohe Dosen von Lysozym mit einem pH 6,8-7,0 verabreicht. Auch BUYANOSVSKAJA (4) berichtet über günstige Lysozymwirkung bei Augengeschwüren, postoperativen Infektionen und Verbrennungen. GRIGORYAN (63) konnte bei 42 Kühen mit subklinischer Mastitis durch Infusion von Milch mit hohem Lysozymtiter in die erkrankten Viertel schnelle Heilung erzielen. ORZALESI (44) berichtet über zufriedenstellende Erfolge bei der Behandlung von Keratitis durch Herpesvirus mit Lysozym.

2.15. LYSOZYM UND MASTITIS

Die wenigen Angaben aus der Literatur über die Zusammenhänge zwischen Lysozymkonzentration und Mastitis sind sehr widersprüchlich. EMELJJANOV (41) verglich Lysozymtiter von freigehaltenen Rindern mit solchen, die angebunden waren. Die zweite Gruppe zeigte niedrigere Lysozymwerte und bis zu 29% klinische bzw. 60% subklinische Mastitis, gegenüber 14- bzw. 44% der Vergleichsgruppe. Kühe mit hoher Leistung, die resistent gegen Mastitis sind, sollen dieser Arbeit nach hohe Lysozymwerte in der Milch haben. Einen laktationsabhängigen Spiegel konnte der Autor nicht feststellen. Demgegenüber wies MUTOVIN (103) auf höheren Lysozymgehalt der Milch während der Früh-laktation hin und GRIGORYAN (62) ergänzte diese Aussage dahingehend, daß die höchsten Werte im 2.-6. Laktationsmonat auftreten. Auch MATUSEVICH und VYSOKOS (92) stellten in den ersten Monaten der Laktation höhere Lysozymkonzentrationen in der Milch fest.

LEKVEISHVILI (90) studierte Zusammenhänge über Lysozym und Euterentzündung über einen Fütterungsversuch. Er teilte 18 Kühe mit durchschnittlichen Lysozymtitern in eine Testgruppe von 10 und eine Kontrollgruppe von 8 Tieren auf. Die Testgruppe erhielt nur 25-30 kg Maissilage schlechter Qualität über einen Zeitraum von einem Monat. Damit wurde ein Mangel an verdaulichem Protein, Ca, P und Karotin erzeugt. Das Ergebnis war, daß der Lysozymspiegel fiel. Während derselben Zeit stieg die Zahl der hämolytischen Staphylokokken-Stämme aus den Vierteln der Testkühe von 4 auf 11 an, während die Kontrolltiere keinen Zuwachs pathogener Stämme aufwiesen. Die meisten pathogenen Stämme fielen mit den niedrigsten Lysozymwerten zusammen.

Ähnliche Fütterungsversuche mit Spurenelementen hatten keinen signifikanten Effekt auf den Lysozymgehalt der Milch (126).

Einige Forscherteams untersuchten den Einfluß der Euterform auf Lysozymgehalt und Mastitis.

KUSHNER (88) untersuchte 56 Kühe mit ungleichmäßiger Euterentwicklung. Dabei trat in den Vierteln, die weniger als 25% des gesamten Milchertrages lieferten, mehr Mastitis auf als bei denjenigen, bei denen die Produktion über 25% lag. Für erstere war die Korrelation Leukozytenzahl-Abweichung von gleichmäßiger Euterentwicklung 0.38-0.55. Die entsprechende Korrelation in Hinblick auf die Lysozymtiter gibt der Untersucher mit -0.26 bis -0.43 an. Bei einer anderen Tiergruppe von 400 Kühen konnte er keine Beziehung Mastitis-Euterform feststellen. Andere Verfasser (53, 89) vertreten dagegen die Meinung, daß unabhängig vom Lysozymtiter Tiere mit hoher Resistenz gegen Mastitis ein nicht herabhängendes oder pendelndes, symmetrisches und schalenförmiges Euter haben.

Zweifellos besteht in gewissen Familien aller Zuchten eine erhöhte Neigung bzw. Widerstandsfähigkeit für Mastitis. Das macht auch verständlich, warum Heritabilitätswerte für Mastitisresistenz von 0.12 bis 0.726 errechnet wurden (2, 89, 136).

Gleichmäßig hohe Werte wurden für die Korrelation zwischen Leukozytenzahl und klinischer Mastitis gefunden. Der höchste belief sich auf 0.98 (2, 143).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. TIERMATERIAL

Als Untersuchungsmaterial diente die etwa 100 Stück starke Holstein-Friesian Herde des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim. Es wurden von den Tieren an demselben Tage etwa 40 ml Blut und genausoviel Milch genommen. Die Blutentnahme fand 2 mal wöchentlich zu folgenden Zeitpunkten statt:

8 - 9	Wochen ante partum
1	Woche ante partum
6 - 24	Stunden post partum
1,2,3,5	Wochen post partum

anschließend alle 2 Monate.

Milchproben wurden erst ab einer Woche nach der Geburt entnommen. In die Blutentnahme wurden Kalbinnen miteinbezogen. Der Termin 6-24 Std. post partum wurde nur wahrgenommen, wenn er auf die Entnahmetage fiel. War das nicht der Fall, wurde er nicht berücksichtigt, um die Tiere nicht zusätzlich zu belasten. Außerdem wurde zu diesem Termin nur Blut genommen. Auf eine Milchprobe wurde verzichtet, da die Untersuchungen auf einer Zellgehaltsbestimmung der Milch mit Hilfe des Schalmtests basierten und dieser in den ersten Tagen post partum auf Grund des physiologisch hohen Zellgehaltes eine positive Reaktion ergibt. Insgesamt wurden 360 Blut- und 1059 Milchproben untersucht.

3.2. AUFBEREITUNG DER PROBEN

Das Blut wurde nach etwa 2 Stunden, die für die Tätigkeit im Bestand und für den Transport in das Institut aufgewendet werden mußten, zentrifugiert (4000 U, 20 Min.) und das Serum abpipettiert. Anschließend erfolgte die Lysozymbestimmung.

Bei der Milch wurden vor dem Melken Viertelgemelksproben steril entnommen und sofort der Schalmtest durchgeführt. Diese diagnostische Methode zur Feststellung eines erhöhten Zellgehaltes in der Milch wurde gewählt, weil auch solche Euter miterfaßt werden sollten, deren Funktionsstörung nicht auf pathogene Keime sondern z.B. auf traumatische Schäden oder auf Melkfehler zurückzuführen sind. Vor der Gewinnung des Serums erfolgte eine pH-Wert Bestimmung. Das Fett wurde durch Zentrifugieren (3000 U, 10 Min.) und anschließendes Abspateln entfernt. Im Anschluß daran wurde die Probe mit 0,5 n HCL auf pH 4,6 eingestellt und das ausgefallene Kasein abzentrifugiert. Sofort danach wurde der Oberstand mit 0,5 n NaOH auf pH 6,6 eingestellt und auf den Lysozymgehalt hin untersucht. Bei den Schalm-positiven Viertelgemelksproben wurde nach dem 1. Zentrifugieren der Bodensatz auf Blut-, Agar- und Gassnerplatten ausgestrichen und in Nährbouillon überimpft. Es folgte Bebrüten bei 37°C für 24 Stunden. Bei negativem Ergebnis der Platten wurden Proben aus der Bouillon erneut auf Platten ausgestrichen. Auftretende Keime wurden differenziert.

3.3. BESTIMMUNG DES LYSOZYMGEHALTES

Als Teststamm diente *Mikrococcus lysodeikticus* ATCC 4698-6. Die Bakterien wurden in einer mit 2% Glukose angereicherten Standard-Nährbouillon 24 Std. bei 37°C gezüchtet. Nach dem Bebrüten wurden die Bakterien abzentrifugiert (3000 U, 10 Min.) und in PBS gewaschen. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde *Mikrococcus lysodeikticus* in PBS suspendiert und die gewonnene Bakterien-suspension im Beckmann-Spektralphotometer (DB) bei einer Wellenlänge von 450 nm auf einen Transmissionswert von 15 % eingestellt.

Zur Lysozymbestimmung wurde zunächst eine Eichkurve mit kristallinem Hühnereiweiß-Lysozym (Serva, Heidelberg) erstellt.

1 E des Lysozyms vermindert die Extinktion von *Mikrococcus lysodeikticus* bei 450 nm um 0,001/Min. bei pH 6,24 und 25°C.

Ausgehend von einer Lysozymverdünnung von 1:10 000 in PBS wurde eine fortlaufende Verdünnungsreihe von 12 Stufen in 2-er Potenzen gelegt. Zu dieser Verdünnungsreihe des Lysozyms wurden im Abstand von einer Minute 5 ml der eingestellten Bakteriensuspension gegeben. Nach 20 Min. bei 21°C erfolgte das Ablesen der Transmissionswerte im Beckmann-Spektralphotometer bei 450 nm gegen eine Kontrolle mit PBS, wobei der Minutenabstand von Verdünnungsstufe zu Verdünnungsstufe wieder genau eingehalten wurde. Dieses Verfahren war notwendig, um für jeden Ansatz genau die gleiche Reaktionszeit von 20 Min. zu gewährleisten. Um Meßungenauigkeiten auszuschließen, wurde jede Verdünnungsreihe 3-fach angesetzt und der Mittelwert errechnet. Diese Methode wurde wiederholt durchgeführt, bis sich nahezu identische Werte ergaben.

Um Zwischenwerte zu erhalten, wurde das Verfahren mit einer Ausgangsstufe der Lysozymverdünnung von 1:15000 erneut angewendet. Danach wurde aus 30 Werten für jede Verdünnungsstufe zu jedem Transmissionswert die zugehörige Lysozymkonzentration errechnet.

Denjenigen Ausschnitt, der für die Versuchswerte von Bedeutung ist, zeigt die nachstehende Tabelle 1.

Mit Hilfe der gefundenen Eich-tabelle wurde die Lysozymkonzentration im Milch- und Blutserum bestimmt.

Je 5 ml Blut- bzw. Milchserum wurden mit 5 ml der eingestellten Bakteriensuspension von *Mikrococcus lysodeikticus* versetzt. Die Reaktionspartner wurden in einminütigem Abstand zusammengebracht und 20 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Transmission bei 450 nm im Beckmann-Spektralphotometer (DB). Die hierbei gewählten Werte von 450 nm Wellenlänge und 15% eingestellter Transmission der *Mikrococcus lysodeikticus* Suspension wurden deshalb ausgesucht, weil hierbei ein sehr großer Teil des Meßbereichs ausgenutzt wurde und ein entsprechend gutes Ablesen der Ergebnisse möglich war.

Tabelle 1: Eichwerte für Lysozymkonzentration

Trans- mission (450 nm)	Lysozym- konzentration (γ /ml)	Trans- mission (450 nm)	Lysozym- konzentration (γ /ml)
30.0	0.008	30.5	0.010
31.0	0.012	31.5	0.015
32.0	0.019	32.5	0.023
33.0	0.028	33.5	0.034
34.0	0.042	34.5	0.050
35.0	0.060	35.5	0.071
36.0	0.084	36.5	0.099
37.0	0.116	37.5	0.135
38.0	0.157	38.5	0.181
39.0	0.208	39.5	0.238
40.0	0.271	40.5	0.307
41.0	0.347	41.5	0.390
42.0	0.437	42.5	0.487
43.0	0.541	43.5	0.598
44.0	0.659	44.5	0.724
45.0	0.792	45.5	0.863
46.0	0.938	46.5	1.015
47.0	1.095	47.5	1.178
48.0	1.262	48.5	1.349
49.0	1.438	49.5	1.527
50.0	1.618	50.5	1.710
51.0	1.802	51.5	1.894
52.0	1.986	52.5	2.077
53.0	2.167	53.5	2.256
54.0	2.344	54.5	2.431
55.0	2.515	55.5	2.597
56.0	2.678	56.5	2.755
57.0	2.831	57.5	2.904
58.0	2.974	58.5	3.042
59.0	3.107	59.5	3.170
60.0	3.230	60.5	3.288

3.4. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Alle erhaltenen Werte wurden zusammen mit den bekannten Daten der Tiere (Alter, Anzahl der Laktationen, Abkalbedatum) auf Lochkarten übertragen und mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung (Leibniz Rechenzentrum) ausgewertet.

Folgende Abkürzungen werden gebraucht:

n = Zahl der Proben

$\bar{x}$ = Durchschnittliche Lysozymkonzentration in γ/ml

s = Standardabweichung

r = Korrelationskoeffizient

4. E R G E B N I S S E

4.1. Lysozymkonzentration des Blutes

Die beobachteten Lysozymkonzentrationen im Blut der untersuchten Kühe und Färsen zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Lysozymkonzentrationen im Blut von Kühen und Färsen

	n	$\bar{x}$	$\pm$	s
Färsen	93	0.688	$\pm$	0.541
Kühe	267	1.314	$\pm$	0.727

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die Lysozymkonzentration im Blut der untersuchten Färsen niedriger ist als bei den Kühen.

4.2. Lysozymkonzentration der Milch

Die Lysozymkonzentration der Milch zeigte eine deutliche Korrelation mit dem Ergebnis des Schalmtests derart, daß die Lysozymkonzentration mit steigendem Zellgehalt erhöht war. Dieses Ergebnis trat gleichmäßig in der Summe aller Viertelgemelksproben (Tabelle 3) wie auch in jedem einzelnen Viertel (Tabelle 4) auf.

Tabelle 3: Lysozymkonzentration in der Milch

Ergebnis der Schalmtests	n	$\bar{x}$	$\pm$	s
-	838	0.734	$\pm$	0.319
+	128	1.109	$\pm$	0.394
++	89	1.474	$\pm$	0.495
+++	4	2.370	$\pm$	0.783

Tabelle 4: Lysozymkonzentration in der Milch, aufgeschlüsselt nach Eutervierteln.

Milchviertel	Ergebnis des Schalmtests	n	$\bar{x}$	$\pm$	s
A (vorne rechts)	-	224	0.732	$\pm$	0.324
	+	28	1.090	$\pm$	0.354
	++	15	1.353	$\pm$	0.335
	+++	0			
B (hinten rechts)	-	205	0.730	$\pm$	0.317
	+	35	1.116	$\pm$	0.437
	++	24	1.489	$\pm$	0.675
	+++	3	2.084	$\pm$	0.654
C (vorne links)	-	217	0.748	$\pm$	0.319
	+	27	1.181	$\pm$	0.383
	++	21	1.358	$\pm$	0.448
	+++	0			
D (hinten links)	-	192	0.724	$\pm$	0.316
	+	38	1.067	$\pm$	0.395
	++	29	1.608	$\pm$	0.398
	+++	1	3.230		

4.3. Beziehung zwischen der Lysozymkonzentration im Blut und derjenigen in den Eutervierteln

Diese Beziehung wurde in zweifacher Hinsicht untersucht. Bei der ersten Berechnung wurden die Lysozymwerte aller Viertel berücksichtigt, bei der zweiten nur die Lysozymkonzentrationen in den Schalm-negativen Vierteln. Damit sollte eine mögliche Überlagerung einer Beziehung zwischen den Blut- und Milchwerten durch die erhöhten Lysozymwerte der Schalm-positiven Viertel ausgeschlossen werden.

(Tabelle 5 und 6)

Tabelle 5: Korrelation zwischen den Lysozymkonzentrationen im Blut und in der Milch aus einzelnen Eutervierteln.

Euterviertel	r	n
A	0.1070	267
B	0.0444	267
C	0.1396	265
D	0.0303	260
Durchschnitt der Gesamt- milch	0.0911	267

Tabelle 6: Korrelation zwischen den Lysozymkonzentrationen im Blut und in der Milch aus einzelnen Schalm-negativen Viertel-gemelksproben.

Euterviertel	r	n
A	0.0588	224
B	0.0751	205
C	0.1650	217
D	0.1344	192

Wie aus der Tabelle 5 und 6 zu ersehen ist, läßt sich für keine der beiden Gruppen eine signifikante Korrelation nachweisen.

4.4. Beziehung zwischen Lysozymkonzentration und pH-Wert in den einzelnen Eutervierteln

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, besteht eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Variablen, die in allen Eutervierteln gleichmäßig ausgeprägt ist.

Tabelle 7: Korrelation zwischen Lysozymgehalt und pH-Wert in Viertelgemelksproben.

Euterviertel	r	n
A	0.3006	267
B	0.3564	267
C	0.2503	265
D	0.3448	260

Daraufhin wurden die Regressionsgeraden der Parameter ermittelt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Regression zwischen Lysozymgehalt und pH-Wert.

y = pH-Wert. x = Lysozymkonzentration der Milch

Euterviertel	Regressionsgerade
A	$y = 6.51 + 0.102 x$
B	$y = 6.52 + 0.106 x$
C	$y = 6.55 + 0.078 x$
D	$y = 6.53 + 0.093 x$

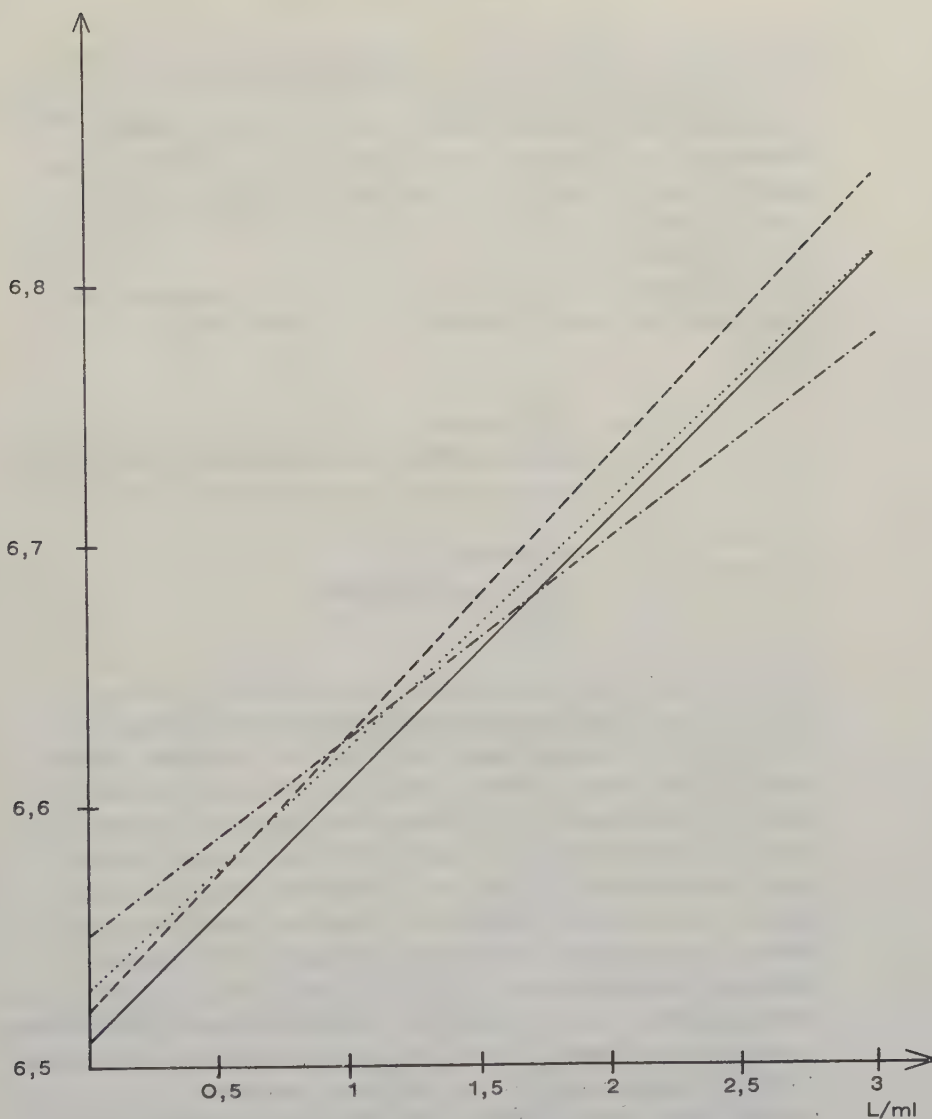


Abb. 6: Einfluß des pH-Wertes auf den Lysozymgehalt der Milch

— Viertel A

- - - - - Viertel C

- - - - - Viertel B

..... Viertel D

4.5 Einfluß der Keimart auf den Lysozymgehalt und den pH-Wert in den einzelnen Eutervierteln

Im Verlauf der Untersuchungen traten bei zahlreichen Versuchstieren Zellgehaltserhöhungen mit vermehrtem Keimgehalt in der Milch auf. Es konnten zahlreiche Keime isoliert werden, die auch als potentielle Mastitisserreger von Bedeutung sind.

Der Übersichtlichkeit halber wurden in den folgenden Aufstellungen die Keime nummeriert. In diesem Schlüssel bedeuten:

- 1 = Mikrokokken
- 2 = Streptokokken (ohne β -Hämolysen, CAMP-negativ)
- 3 = Staphylokokken (Koagulase-positiv)
- 4 = E. coli
- 5 = Pseudomonas
- 6 = Aerobe Sporenbildner
- 7 = Hefen

Aus Tabelle 9 geht hervor, daß der Lysozymgehalt in den Eutervierteln mit derjenigen bakteriellen Besiedlung, wo ein statistisch auswertbares Material zur Verfügung stand (Mikrokokken, Streptokokken, Staphylokokken), signifikant ($p < 0.01$) höher war als in "normalen" Vierteln (Schalme-negative Vergleichsproben aus Tabelle 3). Ferner ist aus Tabelle 9 ersichtlich, daß der Lysozymgehalt je nach Keimart variiert. Obwohl keine eindeutige Zuordnung zwischen Keimart und Lysozymkonzentration besteht, fällt doch auf, daß eine Besiedlung des Euters mit Koagulase-positiven Staphylokokken bei 3 Vierteln zu den durchschnittlich höchsten Lysozymwerten führte. Werden dagegen nur die 3 am häufigsten im Untersuchungsmaterial auftretenden Keimarten (Mikrokokken, Streptokokken, Staphylokokken) berücksichtigt, so tritt hinsichtlich des Lysozymgehaltes stets die gleiche Reihenfolge: Staphylokokken > Streptokokken > Mikrokokken in allen Vierteln auf.

Tabelle 9: Lysozymkonzentration in Eutervierteln mit bakterieller Besiedlung.

Viertel	Keim	n	$\bar{x}$	$\pm$	s
A	1	25	1.076	$\pm$	0.321
	2	14	1.186	$\pm$	0.376
	3	8	1.374	$\pm$	0.339
	4	1	1.095		
	5	1	0.938		
	6	3	1.260	$\pm$	0.813
	7	1	1.349		
B	1	25	1.145	$\pm$	0.363
	2	23	1.304	$\pm$	0.560
	3	14	1.700	$\pm$	0.526
	4	1	0.659		
	5	2	1.528	$\pm$	0.128
	6	2	1.063	$\pm$	0.282
	7	0			
C	1	27	1.105	$\pm$	0.354
	2	15	1.220	$\pm$	0.407
	3	11	1.447	$\pm$	0.333
	4	1	1.710		
	5	1	1.438		
	6	1	1.618		
	7	0			
D	1	31	1.211	$\pm$	0.466
	2	31	1.348	$\pm$	0.535
	3	19	1.536	$\pm$	0.481
	4	2	1.263	$\pm$	1.022
	5	0			
	6	1	1.438		
	7	0			

Nun wurde die Auswirkung des Keimgehaltes auf den pH-Wert des entsprechenden Viertels untersucht (Tabelle 10).

Durchschnittlicher pH-Wert

Tabelle 10:

Viertel	Keim	n	$\bar{x}$	$\pm$	s
A	1	25	6.689	$\pm$	0.140
	2	14	6.791	$\pm$	0.190
	3	8	6.706	$\pm$	0.112
	4	1	6.560		
	5	1	6.670		
	6	3	6.623	$\pm$	0.081
	7	1	6.920		
B	1	25	6.651	$\pm$	0.148
	2	23	6.713	$\pm$	0.111
	3	14	6.773	$\pm$	0.128
	4	1	6.590		
	5	2	6.930	$\pm$	0.764
	6	2	6.780	$\pm$	0.198
	7	0			
C	1	27	6.701	$\pm$	0.172
	2	15	6.753	$\pm$	0.165
	3	11	6.764	$\pm$	0.163
	4	1	6.600		
	5	1	6.730		
	6	1	6.530		
	7	0			
D	1	31	6.639	$\pm$	0.135
	2	31	6.695	$\pm$	0.137
	3	19	6.737	$\pm$	0.115
	4	2	6.795	$\pm$	0.106
	5	0			
	6	1	6.640		
	7	0			

Werden alle Keimarten einerseits aufgrund des durchschnittlichen Lysozymgehaltes in den Vierteln und andererseits aufgrund des durchschnittlichen pH-Wertes in den Vierteln geordnet, so ergibt sich für kein Viertel eine signifikante Rangkorrelation zwischen den beiden Einteilungen. Berücksichtigt man dagegen wieder nur die 3 am häufigsten vertretenen Keimarten (Mikrokokken, Streptokokken, Staphylokokken), so tritt wieder bei 3 Vierteln die Rangfolge:

Staphylokokken > Streptokokken > Mikrokokken auf, in einem Viertel lautet die Reihenfolge: Streptokokken > Staphylokokken > Mikrokokken. Hieraus ist zu folgern, daß der Lysozymgehalt mit dem pH-Wert auch in bakteriell besiedelten Vierteln korreliert ist.

4.6 Abhängigkeit der Lysozymwerte in Blut und Milch von Alter und Laktationsstadium

Um diese Frage zu untersuchen, wurde eine zweifache Varianzanalyse mit den Variablen Laktationsstadium und Alter durchgeführt. Das Alter wurde in Anzahl der Laktationen angegeben, wobei die Gruppeneinteilung so erfolgte: eine, zwei, drei und vier, sowie fünf und mehr Laktationen. Bei den Laktationsstadien wurden die Gruppen entsprechend den Milchentnahmeterminen eingeteilt, da eine Einteilung nach Monaten wegen des spezifischen Rhythmus der Probengewinnung unregelmäßige Lücken in den Daten hervorgerufen hätten. Deswegen wurden als Einheiten gewählt: 1. Woche, 2. Woche, 3. Woche und 5. Woche, 13. Woche und später nach dem Abkalben. Die letzte Einteilung (13 Wochen und später) ist vergleichsweise grob, erklärt sich aber daraus, daß aus innerbetrieblichen Gründen des Versuchsgutes eine häufigere Probengewinnung nicht möglich war und eine weitere Unterteilung wegen des zu geringen Zahlenmaterials nicht sinnvoll erschien. Die erhaltenen Ergebnisse zeigt Tabelle 11.

Tabelle 11: Lysozymwerte in Abhängigkeit vom Laktationsstadium

Viertel	Woche	n	$\bar{x}$	$\pm$	s
A	1	42	0.613016	$\pm$	0.301800
	2	86	0.687185	$\pm$	0.287009
	3-5	39	0.795102	$\pm$	0.375266
	>13	55	0.857326	$\pm$	0.315206
B	1	34	0.561320	$\pm$	0.280034
	2	80	0.716801	$\pm$	0.287044
	3-5	35	0.832735	$\pm$	0.352484
	>13	54	0.799068	$\pm$	0.317980
C	1	39	0.595384	$\pm$	0.295578
	2	89	0.720033	$\pm$	0.296752
	3-5	37	0.828740	$\pm$	0.341344
	>13	52	0.834472	$\pm$	0.343801
D	1	35	0.581256	$\pm$	0.315097
	2	82	0.652762	$\pm$	0.311164
	3-5	33	0.814093	$\pm$	0.340311
	>13	47	0.795655	$\pm$	0.361379

Das Ergebnis der Varianzanalyse der Lysozymwerte aus den Viertelgemelksproben zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12: Zweifache Varianzanalyse: Lysozymgehalt der Milch in Abhängigkeit vom Laktationsstadium und der Altersgruppe.

Variationsursachen	SQ	FG	MQ
<u>Viertel A</u>			
Zw. Lakt. Stadien	1.78534	3	0.595114 ^{x)}
Zw. Altersgruppen	0.01684	3	0.005614 (n.s.)
Wechselwirkung	1.64061	9	0.182290
Innerhalb U-Gruppen	19.7952	206	0.096093
Insgesamt	23.2380	221	0.105149
<u>Viertel B</u>			
Zw. Lakt. Stadien	1.60694	3	0.535646 ^{x)}
Zw. Altersgruppen	0.15998	3	0.053329 (n.s.)
Wechselwirkung	1.28849	9	0.143166
Innerhalb U-Gruppen	17.2317	187	0.092148
Insgesamt	20.2872	202	0.100431
<u>Viertel C</u>			
Zw. Lakt. Stadien	1.60379	3	0.534595 ^{x)}
Zw. Altersgruppen	0.39861	3	0.132871 (n.s.)
Wechselwirkung	0.73687	9	0.081875
Innerhalb U-Gruppen	20.1566	201	0.100282
Insgesamt	22.8959	216	0.105999
<u>Viertel D</u>			
Zw. Lakt. Stadien	1.53582	3	0.511940 ^{x)}
Zw. Altersgruppen	0.75537	3	0.251791 (n.s.)
Wechselwirkung	1.13621	9	0.126245
Innerhalb U-Gruppen	19.0402	181	0.105194
Insgesamt	22.4676	196	0.114630

^{x)} $p < 0.01$

(n.s.) = nicht signifikant

Aus der Varianzanalyse der Milchwerte ergibt sich eine signifikante Abhängigkeit der Lysozymkonzentration vom Laktationsstadium in dem Sinne, daß die Lysozymkonzentration in der Milch mit zunehmender Dauer der Laktation ansteigt. Keinen signifikanten Einfluß hatte dagegen das Alter (= Anzahl der Laktationen).

Für die Lysozymwerte im Blut ergab sich eine Abhängigkeit sowohl vom Laktationsstadium als auch vom Alter der Tiere. (Tabelle 13 und 14)

Tabelle 13: Lysozymwerte im Blut in Abhängigkeit vom Alter und Laktationsstadium der Kühe.

a) Laktationsstadium (Woche)	n	$\bar{x}$	$\pm$	s
1	47	1.02605	$\pm$	0.59771
2	94	1.44605	$\pm$	0.74196
3-5	43	1.48397	$\pm$	0.85607
>13	80	1.26934	$\pm$	0.63483
b) Alter (Laktationen)				
1	67	0.79830	$\pm$	0.39785
2	59	1.51646	$\pm$	0.77221
3-4	46	1.60120	$\pm$	0.71067
>5	92	1.44502	$\pm$	0.69401

Tabelle 14: Zweifache Varianzanalyse: Lysozymgehalt des Blutes
in Abhängigkeit vom Laktationsstadium und der Altersgruppe.

Variationsursache	SQ	FG	MQ
Zw. Lakt. Stadium	6.92586	3	2.30862 x)
Zw. Altersgruppen	25.5831	3	8.52771 x)
Wechselwirkung	6.38374	9	0.70930
Innerhalb U-Gruppen	98.2818	248	0.39629
Insgesamt	137.175	263	0.52157

x) $p < 0.01$

5. B E S P R E C H U N G D E R E R G E B N I S S E

Es wurde der Versuch gemacht, die Lysozymkonzentration des Blutes und der einzelnen Euterviertel in ihrem Verhalten untereinander und ihrer Beziehung zu bestimmten biologischen Faktoren zu verfolgen. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen jedoch einige Umstände berücksichtigt werden, die für die Auswertung von bestimmendem Einfluß sind.

An erster Stelle dieser Faktoren möchte ich das Tiermaterial nennen, das für die Untersuchung herangezogen wurde. Es handelt sich ausschließlich um Tiere der Rasse Holstein-Friesian, und es wäre ohne weiteres denkbar, daß hier rassenspezifische Merkmale, die bei anderen Rassen nicht oder in verändertem Maße vorhanden sind, Eingang in die Arbeit gefunden und die Ergebnisse beeinflußt haben könnten. Desweiteren wurden an diesen Tieren auch Versuche verschiedener Art von anderen Instituten durchgeführt, die möglicherweise durch die zusätzliche Belastung Veränderungen in den physiologischen Werten der Tiere hervorgerufen haben. Aus diesen Gründen wäre es nicht zu vertreten, die Ergebnisse vorbehaltlos auf die ganze Spezies Rind zu übertragen.

Ein weiterer Punkt, der für die Auswertung von Bedeutung ist, wäre die Häufigkeit der Probeentnahme. Dieser Modus, der auf Seite 45 erklärt wurde, zeigt zwar eindrucksvoll die Veränderungen in den Lysozymkonzentrationen zwischen bestimmten Zeiträumen, läßt aber die genau datierte Bestimmung eines Peaks während des Laktationsverlaufes nicht zu. Unter die Gruppe der durch die Versuchsanordnung bestimmten Faktoren fällt auch die Unterteilung aller Werte auf die einzelnen Viertel. Dadurch wird das gesamte Untersuchungsmaterial in relativ kleine Gruppen aufgesplittet.

Auf der anderen Seite ist aber dieses Verfahren unumgänglich, um zu gewährleisten, daß untersuchte Vorgänge oder Abhängigkeiten tatsächlich in allen Vierteln gelten und ein verfälschtes und irritierendes Ergebnis nicht dadurch zustande kommt, daß sich starke Abweichungen zwischen den einzelnen Vierteln gegenseitig ausgleichen.

Die erste wichtige Erkenntnis aus meinen Untersuchungen war die Beobachtung, daß die Lysozymkonzentration im Euterviertel von der Zellzahl abhängig ist, d.h. in Vierteln mit negativem Schalmtest die Lysozymkonzentration am geringsten ist und die höchsten Werte in den Vierteln mit dem höchsten Zellgehalt erreicht werden. Bei dieser engen Beziehung zum Zellgehalt liegt der Schluß nahe, daß die erhöhte Lysozymkonzentration aus den Zellen stammt. Diese Interpretation befände sich in Obereinstimmung mit den Autoren COHN (26, 27), FINK und FINCH (47), GORDON (57), HAMDY (66), JENSEN (77) und TEW et al. (135), die über Freisetzung von Lysozym aus Leukozyten und Gewebszellen berichten, wobei die Freisetzung durch Entzündungsprozesse oder Traumatisierung eines Bereichs stimuliert werden konnte.

Eine Korrelation zwischen der Lysozymkonzentration in der Milch und im Blut konnte nicht nachgewiesen werden. Dabei lag der durchschnittliche Lysozymgehalt des Blutes mit 1.314 gegen 0.734 γ /ml auch deutlich über dem der Euterviertel mit normalem Zellgehalt.

Die fehlende Abhängigkeit des Lysozymgehaltes der Milch von dem Lysozymgehalt des Blutes gestattet es, das Euter in bezug auf eine unspezifische Infektionsresistenz als geschlossenes System zu betrachten. In dieser Eigenschaft würde es sich auch besonders für weitergehende Arbeiten in dieser Richtung eignen.

In signifikanter Weise trat eine Beziehung zwischen der Lysozymkonzentration und dem pH-Wert in den einzelnen Eutervierteln zutage. Diese konnte sowohl arithmetisch als auch

graphisch anschaulich dargestellt werden. Da in ähnlicher, aber weit schwächerer Form eine Verbindung zwischen pH-Wert und Keimart bestand, konnte eine Abhängigkeit zwischen bestimmten Keimen und dem Lysozymgehalt des Euterviertels nicht mehr überraschen. Dies konnte für Mikrokokken, Streptokokken und Staphylokokken nachgewiesen werden, andere Erreger traten dagegen selten in Erscheinung. Eine Erklärung dafür, daß eine Staphylokokkenbesiedlung im Vergleich zu anderen Keimen die höchsten Lysozymkonzentrationen in der Milch verursachte, könnte darin liegen, daß diese Bakterienart oft tiefer in das interstitielle Gewebe eindringt und dadurch auch größere Irritationen der Gewebezellen hervorruft. Die Abweichungen in den pH-Werten zwischen den verschiedenen Keimen beschränken sich auf den alkalischen Bereich, da ausgesprochen sauer reagierende Milch während der Untersuchungen nicht vorkam. Die Euterinfektionen mit Staphylokokken zeigten in der vorliegenden Arbeit die stärkste Herabsetzung der sekretorischen Aktivität des Euters, was sich in den durchschnittlich höchsten pH-Werten ausdrückte. Bei den Schalm-positiven Viertelgemelksproben, in denen nur Mikrokokken nachgewiesen werden konnten, liegt die Ursache für den Reizzustand des Euterviertels wahrscheinlich in einer traumatisch oder durch den Melkvorgang hervorgerufenen Affektion. Dabei waren bei dem untersuchten Material diese Euterviertel jedoch durchschnittlich weniger angegriffen als nach Euterinfektionen. Das drückte sich in kleinerer Zellzahl, weniger drastischer Funktionsstörung und dadurch niedrigerem pH aus. Auf diesem Umweg über den Einfluß der nachgewiesenen Keime läßt sich die Korrelation zwischen Lysozymkonzentration des Viertels und entsprechendem pH-Wert leichter verstehen.

Besonders interessant sind die Beziehungen der Lysozymkonzentration in Blut und Milch zum Laktationsstadium und Alter. Bei den Milchwerten konnte lediglich eine Abhängigkeit vom Laktationsstadium nachgewiesen werden. Alle Viertel wiesen zu Beginn der Laktation einen Anstieg des Lysozym-

gehaltes der Milch auf. Dabei zeigten die Viertel B und D die höchsten Werte in dem Abschnitt 3.-5. Woche nach der Kalbung. In den Vierteln A und C lag der durchschnittliche Lysozymgehalt des nächsten Abschnittes noch etwas höher. Da die Anzahl der Proben für alle Viertel nahezu gleich ist, kommt als Erklärung für die Unterschiede nur in Frage, daß die Lysozymwerte für die 13. Woche p.p. in den Vierteln A und C vergleichsweise höher lagen und/oder der Abfall der Lysozymkonzentration im folgenden Zeitraum geringer ausfiel, was zusammen zu einem höheren Durchschnittswert führte. Der Zeitraum der höchsten Lysozymkonzentration in der Milch dürfte somit vom 2.-4. Monat dauern. Diese Angabe deckt sich mit den Untersuchungen von GRIGORYAN (62) und MUTOVIN (103) und steht im Widerspruch zu der von EMELJJANOV (41) et al., die keinen Laktationstrend feststellen konnten.

Die Lysozymkonzentration des Blutes war sowohl vom Laktationsstadium als auch vom Alter der Tiere abhängig. Die höchsten Titer konnten dabei im Zeitraum 3.-5. Wochen nach der Geburt bzw. während der 3. und 4. Laktation festgestellt werden. Kalbinnen besitzen einen deutlich niedrigeren Blutspiegel für Lysozym als Kühe. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch die erste Gravidität und Laktation der Lysozymspiegel im Blut gehoben wird. Er zeigt dabei einen laktationsabhängigen Verlauf und steigt in den folgenden 2-3 Laktationen weiter an. Vergleicht man die durchschnittliche Lysozymkonzentration von $0.688 \text{ } \mu\text{/ml}$ im Blut von Kalbinnen mit dem entsprechenden Wert von $0.798 \text{ } \mu\text{/ml}$ für die 1. bzw. $1.516 \text{ } \mu\text{/ml}$ für die 2. Laktation, so liegt zwischen der 1. und 2. Laktation der größte Unterschied. Offensichtlich spielen hier hormonelle Einflüsse eine entscheidende Rolle, die uns noch weitgehend unbekannt sind und die ein weites Feld für kommende Untersuchungen offen lassen.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurde der Lysozymgehalt im Blut und in der Milch von Kühen einer Holstein-Friesian Herde untersucht. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Die Lysozymkonzentration der Milch steigt mit zunehmendem Zellgehalt in der Milch.
2. Es besteht keine Korrelation zwischen der Lysozymkonzentration im Blut und derjenigen in der Milch.
3. Der Lysozymgehalt der Milch ist korreliert mit dem pH-Wert der Milch. Es ergibt sich eine lineare Regression.
4. Eine Keimbesiedlung von Eutervierteln bewirkt ein Ansteigen des Lysozymgehaltes in der Milch, wiederum in Korrelation mit dem pH-Wert der Milch. In unserem Material führten Euterinfektionen mit Koagulase-positiven Staphylokokken zu höchsten Lysozymwerten in der Milch.
5. Der Lysozymgehalt in der Milch ist abhängig vom Laktationsstadium und steigt bis etwa 13. Woche post partum an. Keinen signifikanten Einfluß hat dagegen das Alter der Kühe.
6. Der Lysozymgehalt des Blutes ist abhängig vom Alter und Laktationsstadium der Kühe. Färsen besitzen niedrigere Lysozymkonzentrationen im Blut als Kühe.

S U M M A R Y

The concentration of lysozyme was studied in blood and milk of Holstein - Friesian cows. Following results were obtained:

1. The lysozyme concentration in milk rises with increasing number of cells in it.
2. There is no correlation between lysozyme concentration in blood and that in milk.
3. The lysozyme level in milk is correlated with its pH-value. This correlation results in a linear regression.
4. Bacterial flora in the quarters of the udder produces an increase of the milk's lysozyme concentration, again in correlation with its pH-value. Udder infections with coagulase-positive staphylococci caused the highest lysozyme concentration in the milk.
5. The lysozyme level in milk shows dependence on the stage of lactation and rises till about 13 weeks post partum. The age of the animals has no significant influence.
6. The lysozyme titres in blood are dependent on the age and on the stage of lactation. Heifers have lower lysozyme titres in blood than cows.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Adams, D.M.: Sensitization by EDTA of clostridium perfringens typ A spores to germination by lysozyme.
J. Bact. 116 , 500 (1973)
2. Afifi, Y.A.: Genetical and some enviromental influences affecting the level of leukocyte counts in the milk of cows.
Anim. Breed. Abstr. 36, 2457 (1968)
3. Akashi, A.: The effect of egg-white lysozyme on the growth of cheese starter organisms.
Dairy Sci. Abstr. 35, 565 (1973)
4. Alderton, G., W.H. Ward and H.L. Fevold: Isolation of lysozyme from egg-white.
J. biol. Chem. 157, 43 (1945)
5. Alderton, G., and H.L. Fevold: Direct crystallisation of lysozyme from egg-white and some crystalline salts of lysozyme.
J. biol. Chem. 164, 1 (1946)
6. Anderson, D.L. and R.C. Johnson: Electron microscopy of immune disrupction of leptospire: action of complement and lysozyme.
J. Bact. 95, 2293 (1968)
7. Asamer, H., F. Schmakl und H. Braunsteiner: Der immunzytologische Lysozymnachweis in menschlichen Blutzellen.
Acta Haemat. 41, 49 (1969)

8. Baker, R.C., S.E. Hartsell and W.J. Stadelman:
Lysozyme studies on chicken egg
chalazae.
Fd. Res. 24, 529 (1959)
9. Balazs, T. and R.R. Roepke: Lysozymuria induced in rats
by nephrotoxic agents.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 123, 380 (1966)
10. Birdsell, D.C. and E.H. Cota-Robles: Production and
ultrastructure of lysozyme and EDTA-
-lysozyme spheroplasts of E.coli.
J. Bact. 93, 427 (1967)
11. Blake, C.C.F., D.F. Koenig, G.A. Mair, A.T.C. North,
D.C. Phillips and V.R. Sarma: Structure
of hen egg-white lysozyme.
Nature 206, 757 (1965)
12. Blake, C.C.F., G.A. Mair, A.C.T. North and D.C. Phillips:
On the conformation of the hen egg-white
lysozyme molecule.
Proc. R. Soc. 167, 365 (1967)
13. Blake, C.C.F., L.N. Johnson, G.A. Mair, A.C.T. North,
D.C. Phillips and V.R. Sarma: Crystallo-
graphic studies of the activity of hen
egg-white lysozyme.
Proc. R. Soc. 167, 378 (1967)
14. Boasson, E.H.: On the bacteriolysis by lysozyme.
J. Immun. 34, 281 (1938)
15. Braun, O.H.: Lysozymausscheidung mit den Faeces bei
Säuglingsenteritis.
Z.Kinderheilk. 81, 742 (1958)

16. Braun, O.H.: Faekale Lysozymausscheidung bei Säuglingen.
Annls. paediat. 205, 266 (1965)
17. Brew, K., T.C. Vanaman and R.L. Hill: Comparison of the amino acid sequence of bovine lactalbumin and hens egg-white lysozyme.
J. Biol. Chem. 242, 3747 (1967)
18. Buss, D.H.: Isolation and partial characterization of lysozyme from baboon milk.
Biochim. biophys. Acta 236, 587 (1971)
19. Callerio-Babudieri, D. and C. Callerio: Lysozyme granules and lysozyme structures in cell culture.
Nature 212, 1274 (1966)
20. Canfiels, R.E.: The amino acid sequence of egg-white lysozyme
J. biol. Chem. 238, 2698 (1963)
21. Carson, M.E. and A.M. Dannenberg: Hydrolytic enzymes of rabbit mononuclear exudate cells.
J. Immun. 94, 99 (1965)
22. Cattaneo, P. and T. Maggiora-Vergano: The lysozyme content of colostrum, early milk, meconium an feces of the newborn during breast feeding or mixed artificial alimentation.
Chem. Abstr. 43, 3898 (1949)
23. Cernych, V.I.: Saisonbedingte Veränderungen der immunologischen Kennwerte und der Reaktionsfähigkeit bei Kühen.
Landw. Zentbl. 3-69/2-5 (1969)

24. Chandan, R.C., K.M. Shahani and R.G. Holly: Lysozyme content of human milk.
Nature 204, 76 (1964)
25. Chandan, R.C., R.M. Parry jun., and K.M. Shahani: Lysozyme, lipase and ribonuclease in milk of various species.
J. Dairy Sci. 51, 606 (1968)
26. Cohn, Z.A. and E. Wiener: The particulate hydrolases of macrophages: comparative enzymology, isolation, properties.
J. exp. Med. 118, 991 (1963)
27. Cohn, Z.A. and E. Wiener: The particulate hydrolases of macrophages: biochemical and morphological response to particle ingestion.
J.exp. Med. 118, 1009 (1963)
28. Covey, W., P. Perillie and S. T. Finch: The origin of tear lysozyme.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 137, 1362 (1971)
29. Crombie, L.B. and H.L. Muschel: Quantitative studies on spheroplast formation by the complement system and lysozyme on gram-negative bacteria.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 124, 1029 (1967)
30. Davidson, W.D. and D.J. Prockop: Lysozymuria: An enzymatic measure of renal tubular damage.
J. clin. Invest. 43, 1274 (1964)
31. Davies, R.C., A. Neuberger and B.M. Wilson: The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strenght.
Biochim. biophys. Acta 178, 294 (1969)

32. Davis, S.D., D. Gerns and R.J. Wedgwood: Kinetics of the transformation of gram-negative rods to spheroplasts and ghosts by serum. J. Immun. 96, 570 (1966)
33. Davis, S.D., D. Gerns, A. Janetta and R.J. Wedgwood: Potentiation of serum bactericidal activity by lysozyme. J. Immun. 101, 277 (1968)
34. Dimmit, K. and P.S. Sypherd: Association of lysozyme with ribosomes and ribosome precursor particles. J. Bact. 116, 1059 (1973)
35. Dukelow, W.R., H.N. Chernoff and W.L. Williams: Stability of spermatozoan decapicitation factor. Am. J. Physiol. 211, 826 (1966)
36. Ebner, K.E. and U. Brodbeck: Biological role of α -lactalbumin. J. Dairy Sci. 51, 317 (1968)
37. Eckert, E.A., R.H. Reeve and J.W. Beard: Measurement of complement fixation in small volumes. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 83, 111 (1953)
38. Eitenmiller, R.R., H.M. Barnhart and K.M. Shahani: Effect of γ -irradiation on bovine and human milk lysozymes. J. Fd. Sci. 36, 1127 (1971)
39. Eitenmiller, R.R.: Comparative biochemical studies on human and bovine milk lysozymes. Dairy Sci. Abstr. 34, 1364 (1972)

40. Emeljjanov, A.S.: The breeding of lines and families of cows immune to leucosis and mastitis. Anim. Breed. Abstr. 36, 234 (1968)
41. Emeljjanov, A.S. and N.N. Kulakova: Variation in muramidase titre of cow's milk during lactation. Dairy Sci. Abstr. 31, 655 (1969)
42. Feingold, D.S., J.N. Goldman and H.M. Kuntz: Locus of the action of serum and the role of lysozyme in serum bactericidal reaction. J. Bact. 96, 2118 (1968)
43. Ferlazzo, A., G. Lombardo and S. Scalisi: Effect of lysozyme on the bacterial count and the coliform organisms in cow's milk. Dairy Sci. Abstr. 26, 1065 (1964)
44. Ferrari, R., C. Callerio and G. Podio: Antiviral activity of lysozyme. Nature 183, 548 (1959)
45. Ferrini, U.: Changes in amino acid content and inactivation of lysozyme following UV-irradiation. Archs. Biochem. Biophys. 107, 126 (1964)
46. Findley, J.E. and J.M. Akagi: Lysis of desulfovibrio vulgaris by EDTA and lysozyme. J. Bact. 96, 1427 (1968)
47. Fink, M.E. and S.E. Finch: Serum muramidase and granulocyte turnover. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 127, 365 (1968)

48. Flanagan, P. and F. Lionetti: Lysozyme distribution
in blood.
Blood 10, 497 (1955)
49. Fleck, J., J.P. Martin and M. Mock: Action of lysozyme
on penicillin-induced filaments of proteus
vulgaris.
J. Bact. 120, 929 (1974)
50. Fleming, A.: On a remarkable bacteriolytic element
found in tissues and secretions.
Proc. R. Soc. 93, 306 (1922)
51. Fleming, A.: A bacteriolytic ferment found normally
in tissues and secretions.
Lancet I, 217 (1929)
52. Fodstad, F.H.: The frequency of mastitis in different
breeds.
Anim. Breed. Abstr. 30, 1664 (1962)
53. Garjkavyi, F.: Selection of cows for mastitis resistance.
Anim. Breed. Abstr. 37, 1232 (1969)
54. Glad, B.W., J.D. Spikes and L.F. Kumagai: Tyrosine
and thyronine analogs as inhibitors of
the dye-sensitized photoinactivation of
lysozyme.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 131, 1278 (1969)
55. Glynn, A.A. and R. Parkman: Studies with an antibody
to rat lysozyme.
Immunology 7, 724 (1964)
56. Glynn, A.A., W. Brumfitt and M.R.J. Salton: The specific
activity and specific inhibition of in-
tracellular lysozyme.
Br. J. exp. Path. 47, 331 (1966)

57. Gordon, S., J. Todd and Z.A. Cohn: In vivo synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes.
J. exp. Med. 139, 1228 (1974)
58. Grassmann, W.: Zur Kenntnis des natürlichen Papain-Aktivators.
Biochem. Z. 279, 131 (1935)
59. Green, N.M.: Evidence for an genetic relationship between avidins and lysozymes.
Nature 217, 254 (1968)
60. Greenwald, R.A., A.S. Josephson, H.S. Diamond and A. Tsang: Human cartilage lysozyme.
J. clin. Invest. 51, 2264 (1972)
61. Greenwald, R.A. and S. Sajdera: Extracellular localization of lysozyme in rachitic rat cartilage.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 142, 924 (1973)
62. Grigoryan, G.S.: Changes in the muramidase titre of milk in relation to lactation stage.
Dairy Sci. Abstr. 30, 1387 (1968)
63. Grigoryan G.S.: Treatment of subclinical mastitis with 'lysozyme' milk.
Dairy Sci. Abstr. 30, 2103 (1968)
64. Grossgebauer, K. und H. Langmaack: Lysozym, Ergebnisse und Probleme.
Klin. Wschr. 21, 1121 (1968)

65. Grossgebauer, K., B. Schmidt and H. Langmaack:
Lysozyme production as an aid for identification of potentially pathogenic strains of staphylococci.
Appl. Microbiol. 16, 1745 (1968)
66. Hamdy, M.K.: Effect of trauma and infection in poultry tissue.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 131, 409 (1969)
67. Hansen, N.E., H. Karle and V. Andersen: Lysozyme turnover in the rat.
J. clin. Invest. 50, 1473 (1971)
68. Hansen, N.E., H. Karle and V. Andersen and K. Olgaard:
Lysozyme turnover in man.
J. clin. Invest. 51, 1146 (1972)
69. Hawiger, J.: Purification and properties of lysozyme produced by staph. aureus.
J. Bact. 95, 376 (1968)
70. Hayashi, H., Y. Araki and E. Ito: Occurrence in glucosamine residues with free amino groups in cell wall peptidoglycan from bacilli as a factor responsible for resistance to lysozyme.
J. Bact. 113, 592 (1973)
71. Herrmann, J. and J. Jollès: The primary structure of duck egg-white lysozyme.
Biochim. biophys. Acta 200, 178 (1970)

72. Hirsch, J.G. and A.B. Church: The effect of cortisone administrations on polymorphonuclear leukocytic functions and on serum opsonins and bactericidins.
J. clin. Invest. 40, 794 (1961)
73. Holzman, R.S., D.E. Gardner and D.L. Coffin: In vivo inactivation by ozone.
J. Bact. 96, 1562 (1968)
74. Hudspeth, J.P., G.W. Newell, D.R. White, J.G. Berry and R.D. Morrison: An electrophoretic study of chicken egg albumin.
Poult. Sci. 44, 149 (1965)
75. Hunter, M., D. Muir and D. Thirksell: Effect of lysozyme treatment on cell wall ultrastructure in *sarcina flava*.
J. Bact. 116, 483 (1973)
76. Jay, J.M.: Production of lysozyme by staphylococci and its correlation with three other extracellular substances.
J. Bact. 91, 1804 (1966)
77. Jensen, R.S., J.G. Tew and D.M. Donaldson: Extracellular β -lysin and muramidase in body fluids an inflammatory exudats.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 124, 545 (1967)
78. Jollès, P. and J. Jollès: Lysozyme from human milk.
Nature 192, 1187 (1961)
79. Jollès, J., A.C. Dianoux, J. Herrmann, B. Niemann and P. Jollès: Relationship between the cystine and tryptophan contents of 5 different lysozymes and their heat stability and specific activity.
Biochim. biophys. Acta. 128, 568 (1966)

80. Jollès, P.: Relationship between chemical structure and biological activity of hen egg-white lysozyme and lysozymes of different species. Proc. R. Soc. 167, 350 (1967)
81. Jollès, J. and P. Jollès: Human tear and human milk lysozymes. Biochemistry 6, 411 (1967)
82. Kaiser, E.: Inhibition and activation of lysozyme. Nature 171, 607 (1953)
83. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. (1970)
84. Kartasov, P.A.: Veränderungen der antibakteriellen Eigenschaften der Milch von bestrahlten Tieren. Landw. Zentbl. 3-68/12-20 (1968)
85. Kimura, M., N. Ōtaki, K. Murayama, H. Ogawa and S. Kobayashi: Isolation and characterization of human milk and leucocyte lysozymes. Dairy Sci. Abstr. 34, 2275 (1972)
86. King, J.R. and H. Gooder: Induction of enterococcal L-forms by the action of lysozyme. J. Bact. 103, 686 (1970)
87. Kondo, L., L. Hanna and H. Keshishyan: Reduction in chlamydial infectivity by lysozyme. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 142, 131 (1973)
88. Kushner, K.F., I.G. Velitok, E.V. Sebryatov and N.A. Sergienko: Quarter development and mastitis resistance in cows. Anim. Breed, Abstr. 40, 182 (1972)

89. Legosin, G.P.: The resistance to mastitis of cows of various breeds and its heritability. Anim. Breed. Abstr. 35, 1261 (1967)
90. Lekveishvili, N.V.: Changes in some pathogenic properties of staphylococci in the cow's udder in relation to fluctuations in the degree of natural resistance. Dairy Sci. Abstr. 35, 3655 (1973)
91. Lotan, E.: The influence of the sire on the frequency of bovine udder infections. Anim. Breed. Abstr. 36, 1325 (1968)
92. Matusevich, V.F. and P.P. Vysokos: Muramidase activity of blood serum and milk of cattle and methods for its determination. Dairy Sci. Abstr. 31, 4522 (1969)
93. Metcalf, R.H. and R.H. Deibel: Differential lytic response of enterococci associated with addition order of lysozyme and anions. J. Bact. 99, 674 (1969)
94. Metcalf, R.H. and R.H. Deibel: Effect of lysozyme on enterococcal viability in low ionic environment. J. Bact. 113, 278 (1973)
95. Meyer, K., R. Thompson, J.W. Palmer and D. Khorazo: The purification and properties of lysozyme. J. biol. Chem. 113, 303 (1936)
96. Meyer, K., J. W. Palmer, R. Thompson and D. Khoraza: On the mechanism of lysozyme action. J. biol. Chem. 113, 479 (1936)

97. Meyer, K. and E. Hahnel: The estimation of lysozyme by a viscosimetric method.
J. biol. Chem. 163, 723 (1946)
98. Meyer, K., E. Hahnel and A. Steinberg: Lysozyme of plant origin.
J. biol. Chem. 163, 733 (1946)
99. Michael, J.G. and W. Braun: Analysis of sequential stages in serum bactericidal reactions.
J. Bact. 87, 1067 (1964)
100. Miller, T.E.: Killing and lysis of gram-negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid and lysozyme.
J. Bact. 98, 949 (1969)
101. Mizuguchi, Y. and T. Tokunaga: Method for isolation of DNA from mycobacteria.
J. Bact. 104, 1020 (1970)
102. Muschel, L.H., W.F. Carey and L.S. Baron: Formation of bacterial protoplasts by serum components.
J. Immun. 82, 38 (1959)
103. Mutovin, V.J. and M.N. Yabuk: Contents of leucocytes and other cells in milk in relation to muramidase content.
Dairy Sci. Abstr. 31, 3060 (1969)
104. Myrvik, Q.N. and R.S. Weiser: Studies on antibacterial factors in mammalian tissues and fluids.
J. Immun. 74, 9 (1955)

105. Neujahr, H.Y., B. Börstad and J. M. Logardt: Factors affecting the resistance of lacto-bacillus fermenti to lysozyme.
J. Bact. 116, 694 (1973)
106. Nevin, T.A. and W.J. Guest: Complement and lysozyme requirement for spirochetolysis in guinea pig serum.
J. Bact. 94, 1388 (1967)
107. Niewiarowicz, A.: Die Eiproteine.
Landw. Zentbl. 3-70/10-331 (1970)
108. Noller, E.C. and S.E. Hartsell: Bacteriolysis of enterobacteriaceae.
J. Bact. 81, 482 (1961)
109. Ossermann, E. and D.P. Lawlor: Serum and urinary lysozyme in monocytic and monomyelocytic leukemia.
J. exp. Med. 124, 921 (1966)
110. Patterson, D., M. Weinstein, R. Nixon and D. Gillespie: Interaction of ribosomes and the cell envelope of E. coli mediated by lysozyme.
J. Bact. 101, 584 (1970)
111. Pedicek, A.: Die Variationen in der Zusammensetzung der Eiklarproteine einiger Hühnerrassen.
Arch. Geflügelk. 33, 154 (1969)
112. Perri, G.C., M. Faulk, E. Shapiro and W.L. Money: Role of the kidney in accumulation of egg-white muramidase in experimental animals.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 115, 189 (1964)

113. Plecityi, D.F. and V.G. Krasnjanskaja: Messungen der Lysozymaktivität im Eiweiß von Hühnereiern im Verlauf der Embryogenese. Landw. Zentbl. 3-64 /2-78 (1964)
114. Popidova, N.V., T.P. Buzina und Z.V. Ermol'eva: Anwendung der Methode der Gelfiltration für die Bestimmung des Molekulargewichtes von Eiweißen und hochmolekularen Polypeptiden. Landw. Zentbl. 3-68 / 7-498 (1968)
115. Pospisil, L. und A. Jakubowski: Lysozymaktivität des Serums im Verlauf von experimenteller Syphilis des Kaninchens. Z. Immun. Forsch. exp. Ther. 131, 444 (1966)
116. Pospisil, L. und J. Cernohous: Lysozym in der Milch der Muttersau. Fortpfl. Haustiere 4, 338 (1968)
117. Pospisil, L. and A. Kabatova: Thermic gradient of lysozyme activity of the guinea pig complement. Scripta media, t.41, f.1 (1968)
118. Respake, R.: Lysis of gram-negative bacteria by lysozyme. Biochim. biophys. Acta 22, 189 (1956)
119. Revis, G.J.: Immunelectrophoretic identification of lysozyme in saliva. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 137, 90 (1971)

120. Robinson, J.P., R.D. Robinson and J.H. Hash: Electron microscopy of staphylococcus aureus cells and cell walls after treatment with lysozyme chalaropsis.
J. Bact. 117, 900 (1974)
121. Romeo, D. and B. de Bernard: Formation in vitro of a lipoprotein membrane masking lysozyme activity.
Nature 212, 1491 (1966)
122. Schumacher, H.: Neue Erkenntnisse über die Biochemie des Lysozyms.
Fortschr. Augenheilk. 8, 142 (1958)
123. Scibiensky, R., S. Fong and E. Benjamini: Cross tolerance between serologically non cross reacting forms of egg-white lysozyme.
J. exp. Med. 136, 1308 (1972)
124. Semenova, T.P., E.M. Bredzulishvili, T.J. Afanas'eva and O.J. Shevyakova: Characteristics of pathogenic staphylococci isolated in cases of mastitis.
Dairy Sci. Abstr. 35, 4109 (1973)
125. Senn, H.J., B. Chu, J. O'Malley and J.F. Holland: Experimental and clinical studies on muramidase.
Acta haemat. 44, 65 (1970)
126. Shagnakhenetova, R.K.: Content of muramidase in milk of cows from an area rich in Ni.
Dairy Sci. Abstr. 29, 2073 (1967)

127. Sharon, N. .: The chemical structure of lysozyme substrates and their cleavage by the enzyme.
Proc. R. Soc. 167, 402 (1967)
128. Shugar, D.: The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme.
Biochim. biophys. Acta 8, 302 (1952)
130. Skarnes, R.C. and D.W. Watson: The inhibition of lysozyme by acidic polymers from pathogenic bacteria.
J. Bact. 70, 110 (1955)
131. Smolelis, A.N. and S.E. Hartsell: The determination of lysozyme.
J. Bact. 58, 731 (1949)
132. Stevens, C.O. and G.R. Bergstrom: The multiple nature of crystalline egg-white lysozyme.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 124, 187 (1967)
133. Stevens, C.O., J.L. Lond and D. Upjohn: Radiation produced aggregation in crystalline preparations of ribonuclease, lysozyme and trypsin.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 132, 951 (1969)
134. Suzuki, Y and L.J. Rode: Effect of lysozyme on resting spores of bacillus megaterium.
J. Bact. 98, 238 (1969)
135. Tew, J.G., R.L. Scott and D.M. Donaldson: Plasma β -lysin and lysozyme following endotoxin administration and generalized Schwartzmann reaction.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 136, 473 (1971)

136. Velitok, I.G.: Heritability of morphological and functional parameters of the udder. Anim. Breed Abstr. 40, 1721 (1972)
137. Warren, G.H., J. Gray and P. Bartell: The lysis of *pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 70, 617 (1955)
138. Whiteside, T. and W.A. Corpe: Effect of enzymes on the composition and structure of *chromobacterium violaceum* cell envelopes. J. Bact. 97, 1449 (1969)
139. Wilson, L.A. and J.K. Spitznagel: Molecular and structural damage to *E. coli* produced by antibody, complement and lysozyme systems. J. Bact. 96, 1339 (1968)
140. Wilton, J.W., L.D. van Vleck, R.W. Everett, R.S. Guthrie and S.J. Roberts: Genetic and environmental aspects of udder infections. J. Dairy Sci. 55, 183 (1972)
141. Wolin, M.J.: Lysis of *vibrio succinogenes* by EDTA or lysozyme. J. Bact. 91, 1781 (1966)
142. Work, E.: Factors affecting the susceptibility of bacterial cell walls to the action of lysozyme. Proc. R. Soc. 167, 446 (1967)
143. Young, C.W., I.E. Legates and J.G. Lecce: Genetic and phenotypic relationships between clinical mastitis laboratory criteria and udder height. J. Dairy Sci. 43, 54 (1960)

144. Young, J.D. and C.Y. Leung: Immunochemical studies on lysozyme and carboxymethylated lysozyme. *Biochemistry* 9, 2755 (1970)
145. Zehavi, U., J.J. Pollock, V.J. Teichberg and N. Sharon: Oligosaccharides containing glucose as substrate for hen's egg-white lysozyme. *Nature* 219, 1152 (1968)
146. Ziv, G. and R. Risenberg-Tirer: Haemolysin and lysozyme production by staphylococci isolated from bovine udders. *Dairy Sci. Abstr.* 34, 3760 (1972)

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Buschmann für die intensive wissenschaftliche Betreuung sowie das freie Arbeitsklima und den jederzeit gerne gewährten Rat.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes aufrichtig danken.

Danken darf ich auch Herrn Dr. K. Osterkorn für seine wertvolle Hilfe und freundliche Unterstützung bei der Auswertung des Datenmaterials.

Lebenslauf

Ich wurde am 12.12.1950 in Ludwigsburg als Sohn des Kaufmanns Rolf Götze und seiner Ehefrau Irene, geborene Ziegler, geboren.

Von April 1957 bis April 1961 besuchte ich die Grundschule in Ludwigsburg. Im April 1961 wechselte ich nach bestandener Aufnahmeprüfung auf das Friedrich-Schiller-Gymnasium.

Im Juni 1969 legte ich in Ludwigsburg das Abitur ab und begann im Oktober desselben Jahres mit dem Studium der Veterinärmedizin in München. Dort bestand ich am 04. April 1975 das Staatsexamen.

